

Untersuchungen zur strahleninduzierten Bildung
kovalenter Quervernetzungen zwischen
Makromolekülen in E.coli-Bakterien

Diss. Erlangen 1983

von

Rudolf Michael Großkopf

aus

Adelsdorf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Radiologie

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Untersuchungen zur strahleninduzierten Bildung kovalenter Quervernetzungen zwischen Makromolekülen in E.coli-Bakterien

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Rudolf Michael Großkopf

aus

Adelsdorf

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Schübler
Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.1983

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	5
2.1 Aufzucht der Bakterien	5
2.1.1 Verwendetes Nährmedium	5
2.1.2 Kulturen in der stationären Phase	5
2.1.3 Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase	5
2.1.4 Waschen der Zellen	6
2.2 Bestrahlung	6
2.2.1 Bestrahlungsanlage und -anordnung	6
2.2.2 Bestrahlungsbedingungen	8
2.2.2.1 Bestrahlung intakter Bakterien	8
2.2.2.2 Bestrahlung von Cytosol	8
2.3 Zell-Lyse	9
2.3.1 Enzymatischer Aufschluß mittels Lysozym ...	9
2.3.2 Mechanischer Aufschluß mittels Ultraschall	10
2.3.2.1 Funktionsprinzip und Gerät	10
2.3.2.2 Durchführung	11
2.4 Gelfiltration	12
2.4.1 Eigenschaften des verwendeten Gels	12
2.4.2 Durchführung	12
2.5 Photometrische Bestimmungen	13
2.5.1 Geräte und Reagentien	13
2.5.2 DNA-Bestimmung im Zell-Lysat	14
2.5.3 Aufnahme von Absorptionsspektren des Cytosols	14
2.5.4 Proteinbestimmung im Eluat	14
2.5.5 RNA-Bestimmung im Eluat	15
2.5.5.1 Eichkurven der Nachweismethode	16
2.5.5.2 Bestimmung im Eluat	16



3.	<u>ERGEBNISSE</u>	17
3.1	Eichung der Chromatographiesäule	17
3.1.1	Elutionsverhalten von Eichproteinen	17
3.1.2	Elutionsverhalten von Nucleinsäuren	22
3.2	Chromatographische Auftrennung der löslichen Bestandteile des nativen Cytosols ..	25
3.3	Ribonucleinsäurebestimmung im Chromatographieeluat	29
3.3.1	Eichkurven der Nachweismethode	29
3.3.2	RNA-Bestimmung im Eluat nach der Gelfiltration von Cytosol	36
3.4	UV-Absorptionsspektren des Cytosols	37
3.5	Chromatographische Auftrennung der löslichen Zellinhaltsbestandteile nach Bestrahlung	42
3.5.1	Gelfiltration nach Bestrahlung intakter Bakterien in der stationären Wachstumsphase	43
3.5.2	Gelfiltration nach Bestrahlung intakter Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase	49
3.5.3	Gelfiltration nach Bestrahlung von Cytosol aus Bakterien in der stationären Wachstumsphase	52
4.	<u>DISKUSSION</u>	59
4.1	Vergleichende Beurteilung der beiden angewandten Lyse-Verfahren	59
4.1.1	Praktische Durchführbarkeit der Verfahren	59
4.1.2	Ausbeute an UV-absorbierendem Material und ihre Reproduzierbarkeit	60
4.1.3	Gewinnung eines isolierten DNA-Peaks im Chromatogramm	62
4.1.4	Möglichkeiten der Optimierung des Aufschlußverfahrens mittels Lysozym	63
4.2	UV-Absorptionsspektren des Cytosols	66
4.3	Gelchromatographie des Cytosols	73
4.3.1	Strahlenchemische Prozesse in wässrigen Lösungen und in der Zelle in Abwesenheit und in Anwesenheit von Sauerstoff....	73

	<u>Seite</u>
4.3.2	Veränderungen des Elutionsverhaltens der makromolekularen Nucleinsäuren 77
4.3.3	Veränderungen des Elutionsverhaltens der Zellproteine 82
4.3.4	Einfluß von Sauerstoff auf die strahlen- induzierten Veränderungen 86
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> 90
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u> 92

1. E I N L E I T U N G

Seit jeher sind die Lebewesen auf der Erde energiereichen, ionisierenden Strahlen aus dem Weltall und aus Bestandteilen der Erdoberfläche ausgesetzt. Erst durch die Entdeckungen von Röntgen, Becquerel und Curie am Ende des letzten Jahrhunderts wurden dem Menschen derartige Strahlen intellektuell und physikalisch fassbar. Man begann Geräte zu entwickeln, mit deren Hilfe es möglich wurde, selbst ionisierende Strahlung zu erzeugen. So ist der Mensch heute in der Lage, sich diese Strahlen in Forschung, Technik und Medizin in weitem Umfang nutzbar zu machen. Die dadurch wachsende Strahlenbelastung von Mensch und Natur bringt aber Gefahren mit sich, da biologische Systeme gegenüber der schädigenden Wirkung der Strahlen extrem empfindlich sind. Aus diesem Grund, aber auch um die Anwendung z.B. in der Medizin noch zu verbessern, ist es von vordringlichem Interesse, die Mechanismen der Wechselwirkung zwischen lebenden Organismen und ionisierenden Strahlen zu erforschen.

Die Strahlenwirkung umfaßt alle Ebenen der biologischen Organisation. Beginnend mit der physikalischen Absorption der energiereichen Quanten erfolgt über physikochemische Umsetzungen und biochemische Reaktionen die Beeinflussung der Zelle, der elementaren Einheit aller Lebensprozesse. Alterationen der Zelle aber ziehen Veränderungen der einzelnen Gewebe und des Gesamtorganismus nach sich. Da es nicht möglich ist, aufgrund des resultierenden Zustandes der Gewebe oder gar des Gesamtorganismus Rückschlüsse auf die Mechanismen der Strahlenwirkung zu ziehen, ist es zunächst nötig, die Vorgänge bei Strahleneinwirkung auf molekularer Ebene zu studieren.

Das Auftreffen energiereicher Quanten locker ionisierender Strahlen auf Moleküle führt zu deren Ionisation oder energetischen Anregung mit nachfolgender Spaltung (siehe auch

4.3.1). Handelt es sich dabei um Wassermoleküle, so entstehen hydratisierte Elektronen sowie freie H- und OH-Radi-kale (WEISS, 1944; HART u. BOAG, 1962; KEENE, 1963). Be-finden sich im Wasser noch andere Molekülarten, z.B. Bio-moleküle, so können diese mit den primären Radiolysepro-dukten des Wassers auf chemischem Wege reagieren. Dadurch entstehen Bioradikale, die darüber hinaus auch durch die direkte Absorption energiereicher Quanten erzeugt werden können. Die auf diese Weise veränderten Biomoleküle können durch intramolekulare Umlagerungen und verschiedene Arten der Weiterreaktion in einen Zustand irreversibler Schädigung übergehen. Am Beispiel der DNA läßt sich zeigen, daß die resultierenden strahleninduzierten Defektzustände von Biomolekülen sehr komplex sind. So kann es hier zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen kommen, zu Basenveränderungen und Basenverlusten, zur Entstehung denaturierter Zonen und in-tramolekularer Vernetzungen. Noch vergleichsweise wenig erforscht, jedoch nicht minder wichtig für Veränderungen oder auch Schädigungen an lebenden Systemen durch Einwirkung ener-giereicher Strahlung (SMITH, 1975), ist die Quervernetzung von DNA mit anderen Biomolekülen, besonders mit Proteinen. Für die Bestrahlung mit UV-Licht war dies eine der ersten in-vivo-Reaktionen, von der berichtet wurde (SMITH, 1962; ALEXANDER u. MOROSON, 1962). Obwohl zweifellos sehr viel Wissen aus Studien mit UV-Licht zumindest richtungsweisend auch über die Wirkung von ionisierenden Strahlen gezogen werden kann, ist es häufig schwierig, analoge Ergebnisse durch Einwirkung von Gamma- oder Röntgenstrahlen zu erzie-len. UV-Licht nämlich wirkt relativ spezifisch auf Nuclein-säuren und Proteine, da es von den Purin- und Pyrimidinbasen bzw. von aromatischen Aminosäuren absorbiert wird. Der di-recte Effekt ionisierender Strahlen hingegen zeigt keine Se-lektivität, d.h. diese können alle Arten von Molekülen gleichermaßen verändern. Auch die indirekte Strahlenwirkung, d.h. Veränderungen durch die Primärradikale des Wassers, ermöglicht eine Vielzahl von Reaktionen. Dennoch ist es meh-

reren Forschern gelungen, anhand von einfachen in-vitro-Systemen Quervernetzungen zwischen den Biomolekülen DNA, RNA und Protein auch nach Einwirkung von Gamma- bzw. Röntgenstrahlen eindeutig nachzuweisen (KASCHE, 1974; SCHÜSSLER, 1976; MINSKY u. BRAUN, 1977; EKERT u. GIOCANTI, 1977; YAMAMOTO, 1977; SCHÜSSLER et al., 1982).

Weniger klar sind noch die Ergebnisse, die bisher durch Bestrahlung komplexer biologischer Systeme hinsichtlich dieser Fragestellung erzielt wurden. Unter einem biologischen System soll hierbei die intakte Pro- oder Eukaryontenzelle bzw. das Lysat solcher Zellen verstanden werden. YAMAMOTO (1975a) vermutete aufgrund von Experimenten mit Säugetierzellen die Entstehung kovalenter Quervernetzungen zwischen RNA und Protein nach Gamma-Bestrahlung. Außerdem vermutet der Autor, daß auch DNA mit Protein oder RNA verknüpft wurde, jedoch in geringerem Umfang. Ebenfalls nach Gamma-Bestrahlung von Säugetierzellen bzw. von isoliertem Chromatin aus solchen Zellen fanden MEE u. ADELSTEIN (1979) Quervernetzungen zwischen DNA und Protein. JESSBERGER (1979) diskutierte die röntgenstrahleninduzierte Molekulargewichtszunahme von Zellproteinen nach Bestrahlung von E.coli-Bakterien als die Vernetzung von Proteinmolekülen untereinander und mit anderen Makromolekülen der Zelle.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, die strahleninduzierte Bildung von kovalenten Quervernetzungen zwischen Biomolekülen bei Bestrahlung unter in-vivo-Bedingungen einer weiteren Abklärung zuzuführen. Für derartige Untersuchungen auf zellulärer Ebene eignen sich Bakterien als die kleinsten und einfachsten Lebewesen am besten. Es werden deshalb intakte E.coli-Zellen bzw. auch isoliertes Cytosol aus solchen Zellen einer Röntgenstrahlung ausgesetzt. Nach der Lyse der bestrahlten Bakterien bzw. nach Bestrahlung des vorher isolierten Cytosols werden Veränderungen der Zellinhaltsbestandteile insbesondere in Hinblick auf

die Entstehung kovalenter Quervernetzungen zwischen Nucleinsäuren und Proteinen durch die Aufnahme von UV-Absorptionsspektren und die gelchromatographische Auftrennung der Proben analysiert. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Beeinflussung der Bildung derartiger Quervernetzungen durch unterschiedliche Bestrahlungsbedingungen gerichtet sein. So wird die Auswirkung der Dosishöhe, der Anwesen- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff sowie der Bestrahlungstemperatur untersucht. Durch Strahleneinwirkung auf Bakterien sowohl aus der stationären Wachstumsphase als auch aus der exponentiellen Phase wird eine etwaige Abhängigkeit der strahleninduzierten Veränderungen vom Zellzyklus überprüft.

Einen nicht unwesentlichen Aspekt dieser Arbeit stellt daneben die kritische Beurteilung der bei den Bestrahlungsversuchen angewandten Verfahren dar. Dadurch soll weiteren strahlenbiologischen Untersuchungen an lebenden Systemen methodisch der Weg bereitet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Aufzucht der Bakterien

2.1.1 Verwendetes Nährmedium

Für die Herstellung von flüssigem Vollmedium wurden 8 g Nutrient-Broth der Fa. DIFCO-Laboratories, Detroit/USA, in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und 40 Min. bei 120 °C autoklaviert. Durch Zusatz von 18 g Bacto-Agar der gleichen Firma zu 8 g Nutrient-Broth und Aufkochen in 1000 ml Aqua bidest. wurde fester Nährboden für Dauerkulturen gewonnen, der vor dem Eingießen in Petrischalen ebenfalls 40 Min. bei 120 °C autoklaviert wurde.

2.1.2 Kulturen in der stationären Phase

E.coli-Bakterien K-12 AB 1157 wurden von der Stammpalte mit einer Platinöse in 100 ml Vollmedium übertragen. Das beimpfte Nährmedium wurde über Nacht in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C belüftet. Am nächsten Morgen befand sich die Zellkultur in der stationären Phase. Die Bakteriendichte in der Suspension wurde mittels Extinktionsmessung bei 578 nm (Spektralphotometer PMQ II, ZEISS, Oberkochen) mit Einmal-Küvetten von 1 cm Lichtweg bestimmt. Die Extinktion betrug dabei ca. 1,2.

2.1.3 Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase

100 ml Vollmedium wurden mit 1 ml Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur (ca. 2×10^9 Zellen/ml) inokuliert und bei 37 °C im Schüttelwasserbad belüftet. Nach etwa 4 h hatte die Kultur die streng logarithmische Wachstumsphase

erreicht, was wiederum durch die Absorptionsmessung bei 578 nm sichergestellt wurde ($E_{578} = 0,6$). Um ein weiteres Zunehmen der Bakteriendichte (ca. 1×10^9 Zellen/ml) zu unterbinden, wurde die Kultur nach Entnahme aus dem Schüttelwasserbad sofort in Eiswasser gestellt.

2.1.4 Waschen der Zellen

Durch Zentrifugieren der Suspension bei 8000 Upm, 20 Min. und 4 °C (BECKMAN-Kühlzentrifuge, Modell J-21 C) wurden die Bakterien aus dem Nährmedium isoliert. Es folgte die Wiederaufnahme der Pellets mit jeweils 10 ml gekühltem 1×10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7 und erneute Zentrifugation. Die Wiederholung dieses Waschvorganges garantierte, daß Reste des Vollmediums aus der Bakteriensuspension entfernt waren.

2.2 Bestrahlung

2.2.1 Bestrahlungsanlage und -anordnung

Für die Bestrahlung stand das vollstabilisierte Industrie-Röntgengerät Isovolt 150 der Fa. R.SELFERT und Co. zur Verfügung. Die Röhrenspannung betrug dabei 150 kV, der Röhrenstrom 20 mA und der Abstand vom Röhrenfokus zum Boden des Bestrahlungsschälchens 8,56 cm.

Es wurde ohne Filterung bis zu einer maximalen Dosis von ca. 60 000 Gy bestrahlt. Bei der Dosisrate von 333 Gy/min. war diese Dosis innerhalb von 3 h erreicht.

Die Dosisrate wurde mittels Fricke-Dosimetrie bestimmt. Bei der Bestrahlung befand sich die Suspension in einem Plastikschälchen, dessen Durchmesser so bemessen war, daß bei einem Probevolumen von 10 ml die Schichthöhe 5 mm betrug.

Das Schälchen war in einen Wassermantel aus Plexiglas eingelassen, der über zwei Schläuche einen geschlossenen Kreislauf mit einem Thermostat (Kryostat der Fa. DR.VIRUS KG, Bonn) bildete und so die Bestrahlung bei verschiedenen Temperaturen ermöglichte.

Außerdem enthielt der Plexiglasmantel eine Zuleitung für Stickstoff, wodurch die Bestrahlung in Abwesenheit von Sauerstoff möglich war.

Den Boden des Bestrahlungsgefäßes bildete ein 4 mm dicker Plexiglasblock, der einem darunter befindlichen Magnetrührgerät auflag.

Nach oben, zur Röhre hin, schloß eine mit einer 0,03 mm dicken Hostaphan-PE-Folie bespannte Ringdichtung das Gefäß ab (Abb. 1).

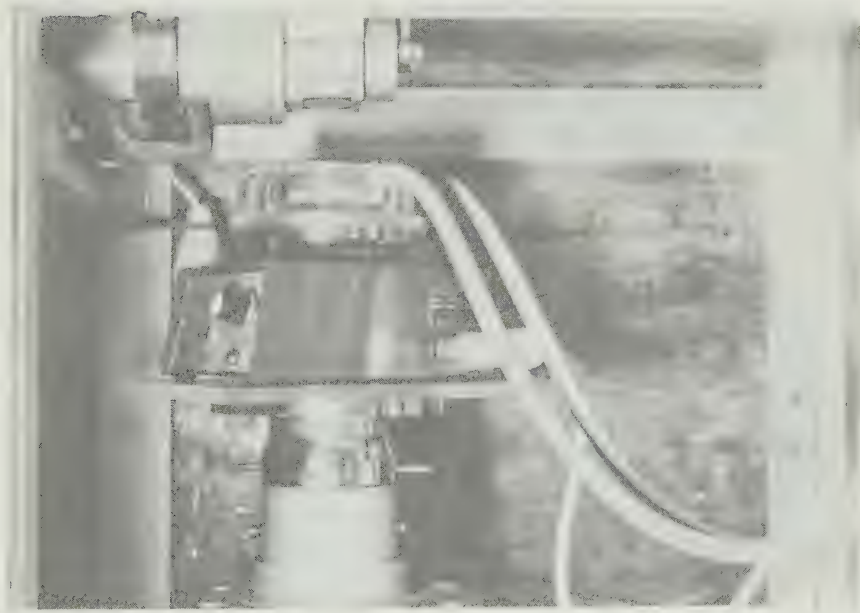


Abb. 1: Bestrahlungsanordnung

2.2.2 Bestrahlungsbedingungen

2.2.2.1 Bestrahlung intakter Bakterien

Die Pellets jeweils zweier Bakterienkulturen, die sich entweder in der stationären Phase (ca. 4×10^{11} Zellen) oder in der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 2×10^{11} Zellen) befanden, wurden in 4 ml bzw. 2 ml 1×10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7 suspendiert, in ein Plastikschälchen überführt und in das je nach Versuchsplanung vorgekühlte oder vorgewärmte Bestrahlungsgefäß eingesetzt.

Bakterien in der stationären Phase wurden bei 2 °C oder bei 37 °C unter Luft oder unter N₂ bestrahlt; Bakterien in der streng logarithmischen Phase bei 2 °C unter N₂.

Bei Bestrahlungen, die unter Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt werden sollten, wurde 2 h vor und während der Bestrahlung wassergesättigtes N₂ über die Suspension geleitet.

Alle Bestrahlungen erfolgten unter ständigem Umrühren der Proben mit Hilfe eines Magnetrührers.

2.2.2.2 Bestrahlung von Cytosol

Hierbei wurden die Zellen zweier Übernachtskulturen mit 10 ml 1×10^{-2} M PO₄-Puffer pH 7 aufgenommen und lysiert. Das so gewonnene verdünnte Cytosol wurde sofort nach der Lyse in Eiswasser gestellt, um den Abbau von Zellinhaltsbestandteilen durch zelleigene Enzyme zu verhindern. Sollte das Cytosol ohne die Zellhüllen bestrahlt werden, so wurden diese durch Abzentrifugieren (60 Min. bei 16 000 Upm und 4 °C) entfernt. Der Überstand bzw. bei Bestrahlung des Cytosols mit den Zellhüllen das gesamte Lysat wurde dann in ein in Eis eingebettetes Plastikschälchen übertragen.

Es wurde unter Luft oder unter N_2 bei 2 °C bestrahlt, wobei die gleichen Bedingungen galten wie bei der Bestrahlung intakter Bakterien.

2.3 Zell-Lyse

2.3.1 Enzymatischer Aufschluß mittels Lysozym

Der enzymatische Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte in enger Anlehnung an die von D.C.BIRDSELL und E.H. COTA-ROBLES (1967) beschriebene Methode.

Die bestrahlten oder unbestrahlten Zellen (ca. 2×10^{11}) wurden nach ihrer Abzentrifugation zunächst in 20 ml 0,01 M Tris-Puffer pH 8 suspendiert und 20 Min. bei 6000 Upm und 4 °C erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 10 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Diese Suspension wurde mit 1,71 g Saccharose versetzt (entspr. 0.5 M) und nach sorgfältiger Durchmischung 15 Min. lang bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 200 µl einer Lysozym-Lösung (5 mg Lysozym in 5 ml Aqua bidest.) erfolgte eine abermalige Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Min.. Nun wurden noch 100 µl (entspr. 10^{-3} M) einer EDTA-Lösung (372 mg Na_2H_2EDTA in 10 ml Aqua bidest.) dazugegeben. 10 Min. später wurden die so entstandenen osmotisch empfindlichen Zellen abzentrifugiert (25 Min. bei 6000 Upm und 4 °C).

Das Zentrifugat wurde in 20 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser aufgenommen und 20 Min. in Eiswasser gestellt. Durch 60-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 Upm und 4 °C wurden die Zellhüllen aus dem durch osmotischen Schock entstandenen Lysat isoliert.

Vom klaren Überstand wurden vorsichtig 15 ml abgehoben, mit SDS auf 1 % eingestellt und 5 Min. bei 100 °C im Wärmeschrank inkubiert.

2.3.2 Mechanischer Aufschluß mittels Ultraschall

2.3.2.1 Funktionsprinzip und Gerät

Die Fähigkeit von Ultraschall, die Zellwände der Bakterien zu zerstören und so die Lyse herbeizuführen, ist wohl auf das bisher noch nicht völlig geklärte physikalische Phänomen der "Kavitation" zurückzuführen. Bei der Ausbreitung des Ultraschalls werden die sich in jeder Flüssigkeit noch befindlichen Gasbläschen wechselweise zusammengepreßt und entlastet. Bei Erreichen einer kritischen, von der Schallfrequenz abhängigen Größe zerplatzen die Bläschen implosionsartig. Dabei entstehen örtliche Druckunterschiede von einigen tausend Atmosphären, durch die es zur Zerstörung der Bakterienzellwände kommt (Abb. 2). ⁺)

Da die hochfrequenten Ultraschallschwingungen letztlich als Wärme von der behandelten Suspension absorbiert wird, ist es erforderlich, während der Beschallung zu kühlen.

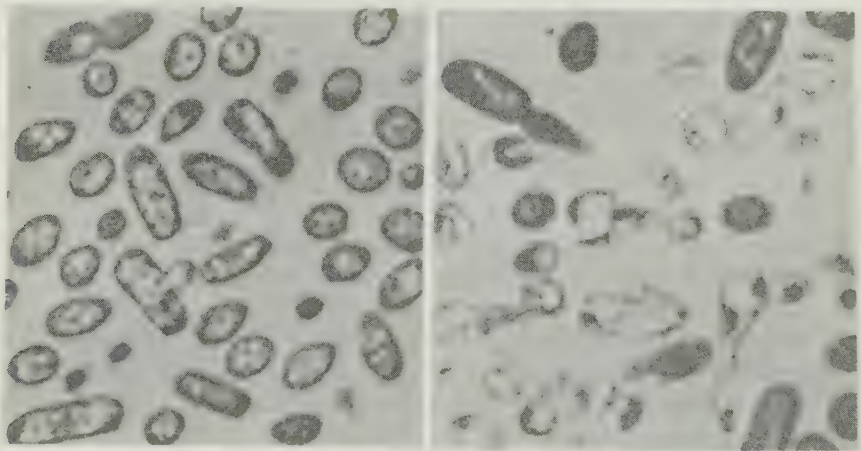


Abb. 2: E.coli-Bakterien vor (links) und nach der Ultraschall-Lyse (Vergrößerung 25 000 x)

⁺) Die Übernahme dieser Abbildung aus einer Informationsschrift der Fa. BRANSON, Danbury/USA, erfolgte mit deren freundlichen Genehmigung.

Die Nutzung dieses Prinzips erfolgte anhand eines SONIFIER B-12 der Fa. Branson Sonic Power Company, Danbury/USA. +)

Die Ultraschallwellen wurden über einen zylinderförmigen Titan-Schallkopf von 12,7 mm Durchmesser in die Suspension übertragen.

Die angewandte Ultraschallintensität von 65 Watt konnte an einem Drehschalter eingestellt werden (max. 150 Watt).

2.3.2.2 Durchführung

Zunächst wurden je nach Versuchsbedingung die unbestrahlten Zellen in 10 ml, die bestrahlten Zellen in 20 ml gekühltem 1×10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7 aufgenommen und in Eis gestellt. Der Aufschluß erfolgte in einem dickwandigen gläsernen Beschallungsgefäß, das während des Vorganges in Eiswasser gehalten wurde. Der Schallkopf des Gerätes tauchte dabei bis zu einem Abstand von 2 mm vom Boden des Gefäßes in die Suspension ein.

Die 10 ml Suspensionen wurden in drei, die 20 ml Suspensionen in fünf Beschallungsfraktionen lysiert, so daß pro Beschallungsansatz ein Probevolumen von max. 4 ml nicht überschritten wurde. Dadurch war eine optimale Effektivität der Ultraschallwellen gewährleistet.

Jeder einzelne Ansatz wurde 4 x 20 sec. lang beschallt. Zwischen den Beschallungsphasen erfolgte eine 20 sec. dauernde Kühlphase.

Die Fraktionen wurden nach der Lyse in ein gemeinsames Zentrifugenglas überführt und in Eiswasser gestellt.

Die noch unbestrahlten Proben konnten nun bestrahlt werden. Aus den bereits bestrahlten Suspensionen wurden durch Zentrifugieren die Zellhüllen entfernt und 15 ml des klaren Überstandes mit SDS auf 1 % eingestellt (Inkubation bei 100 °C, 5 Min.).

+) Dieses Gerät wurde großzügigerweise von Prof. Ogilvie im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.4 Gelfiltration

2.4.1 Eigenschaften des verwendeten Gels

Für die Auftrennung der Bestandteile des Zellinnern wurde das Sepharose-Gel CL 2B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet. Durch die kovalenten Quervernetzungen zwischen den einzelnen Agaroseketten weist dieses Gel gegenüber nicht vernetzten Sepharose-Gelen eine merklich höhere physikalische und chemische Stabilität auf. Aufgrund dessen konnte ohne Bedenken mit SDS-haltigem Elutionspuffer gearbeitet und zudem eine relativ hohe Durchflußrate erzielt werden. Da jedoch Bindungs- bzw. Adsorptionseffekte, die außerhalb des reinen Gelfiltrationsmechanismus liegen und bei normalen Sepharose-Gelen beschrieben wurden, auch bei der Sepharose CL nicht völlig auszuschließen sind, mußte versucht werden, die Bedingungen bei den Auftrennungen stets exakt einzuhalten und möglichst weit zu optimieren. Deshalb wurde der Elutionspuffer mittels einer Boyle-Mariotte'schen Flasche zugeführt, womit ein nahezu konstanter hydrostatischer Druck während der gesamten Auftrennung gewährleistet war.

Das Gel hat eine Ausschußgrenze für globuläre Proteine vom Molekulargewicht von 4×10^7 Daltons und für Polynucleotide von ca. 2×10^7 Daltons. Es ermöglichte also die Auftrennung von sehr großen Biomolekülen.

Der Durchmesser der zur Verfügung stehenden Chromatographiesäule betrug 2 cm und sie konnte bis zu einer Höhe von 100 cm mit Gel aufgefüllt werden.

2.4.2 Durchführung

Vor der Bepackung wurde die Säule mit 2 %iger Maranon-H-Lösung (HENKEL) mehrmals gespült und so von Keimen befreit. Anschließend wurde noch mit 2500 ml Aqua bidest. durchgespült. Nach dem Auffüllen der Säule mit dem Gel erfolgte die

Äquilibrierung des Gelbettes mit 1200 ml des Elutionspuffers (2×10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7 + 0,5 % SDS).

Das mit 1 % SDS versetzte Cytosol wurde unter einem hydrostatischen Druck von 32 cm Wassersäule aufgetragen und eluiert. Eine Nebenwirkung des SDS war es, daß Mikrobeowachstum im Gelbett verhindert wurde; so konnte die Auftrennung ohne Zusatz von bakteriziden Substanzen bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen aufgefangen (Ultro Rac 7000-Fraktionssammler, LKB, Bromma, Schweden). Dabei wurde die Absorption bei 254 nm in einem Durchflußphotometer gemessen (ISCO Type 6 Optical Unit) und auf einem Monitor aufgezeichnet (ISCO, Modell UA 5).

2.5 Photometrische Bestimmungen

2.5.1 Geräte und Reagentien

Ein Spektralphotometer PMQ II der Fa. Carl ZEISS, Oberkochen, diente zur Messung der Extinktion bei 260 nm in den Eluatfraktionen und zur biochemischen Protein- und Nukleinsäurebestimmung.

Für die Aufzeichnung von Absorptionsspektren des Cytosols im UV-Bereich (360 nm bis 240 nm) wurde ein Spektralphotometer Modell 24, BECKMAN, USA, verwendet.

Die Messungen bei den Nucleinsäurebestimmungen erfolgten in Makro-Einmalküvetten, MÜLLER-ratiolab, Dreieich, alle übrigen Messungen in Suprasil-Quarzküvetten, HELIMA, Mühlheim. Beide Küvettenarten hatten einen Lichtweg von 1 cm. Sämtliche benötigte Reagentien wurden von MERCK, Darmstadt, bezogen.

2.5.2 DNA-Bestimmung im Zell-Lysat

Um festzustellen, in welcher Fraktion sich die DNA nach den beiden Lyse-Verfahren befand, wurde sowohl nach dem enzymatischen als auch nach dem mechanischen Aufschluß eine biochemische Bestimmung der DNA im Lysat vor und nach dem Abzentrifugieren der Hüllen durchgeführt.

Dabei erwies sich der Nachweis aufgrund der Diphenylaminreaktion nach BURTON (1956) in geringer Abwandlung als anwendbar. Zur Herstellung des Diphenylaminreagens wurden 1,5 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig gelöst, der schon 1,5 ml konz. H_2SO_4 enthielt. Kurz vor Gebrauch wurde zu 20 ml Diphenylaminreagenz 0,1 ml einer Acetaldehyd-Lösung gegeben (16 mg Acetaldehyd in 1 ml Aqua bidest.).

Die Gewinnung eines Nucleinsäurehydrolysates aus den jeweiligen Proben und die Messung der DNA erfolgte entsprechend einer Anleitung zum Physiologisch-Chemischen Praktikum von W. FISCHER (1977).

2.5.3 Aufnahme von Absorptionsspektren des Cytosols

Vor dem Auftragen auf das Gel wurde ein Absorptionsspektrum des bereits mit SDS versetzten Cytosols im Wellenlängenbereich von 360 nm bis 240 nm aufgezeichnet.

Dazu wurden 0,3 ml des Cytosols mit 3 ml Elutionspuffer verdünnt und gegen den gleichen Puffer als Leerwert ausgemessen.

2.5.4 Proteinbestimmung im Eluat

Da sich im Chromatographieeluat SDS befand, geschah die Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen mittels einer Modifikation der Biuret-Methode nach WANG und SMITH (1975), mit der diese sogar in 10 %igen SDS-Lösungen eine Proteinbestimmung vornahmen.

Folgende Reagentien waren dazu erforderlich:

- Folin-Reagenz:

Folin-Cicolteau-Phenol-Reagenz 1:1 verdünnt mit Aqua bidest.

- Alkalische Kupfer-Lösung:

21,3 mg $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ und 14,3 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ wurden in 50 ml Aqua bidest. gelöst. Dazu wurden noch 10 ml einer 20 %igen Na_2CO_3 -Lösung (w/v) und 10 ml 1 N Natronlauge gegeben.

- 10 %ige SDS-Lösung (w/v).

Zu 0,6 ml der jeweiligen Probe wurde 1 ml der alkalischen Kupfer-EDTA-Lösung gegeben und der Ansatz gut durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,6 ml der 10 %igen SDS-Lösung und anschließend 0,1 ml des Folin-Reagenz hinzupipettiert und wiederum sorgfältig durchmischt. Es folgte nun eine erneute 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, nach deren Ablauf die Extinktion in den Reaktionsansätzen bei 500 nm ausgemessen wurde.

2.5.5 RNA-Bestimmung im Eluat

Um Aussagen über den Nucleinsäuregehalt in den einzelnen Eluatfraktionen machen zu können, wurde versucht, die RNA mittels der Orcinreaktion zu bestimmen.

Zur Herstellung des Orcin-Reagenz wurden 0,5 g FeCl_3 in 100 ml konz. HCl gelöst. Etwa 15 Minuten vor Gebrauch der Lösung wurde 1 g Orcin zugesetzt und unter ständigem Rühren gelöst.

2.5.5.1 Eichkurven der Nachweismethode

Die Durchführung dieser biochemischen Färbemethode in Gegenwart von SDS ist noch nicht beschrieben. Deshalb erschien es sinnvoll, zunächst unter verschiedenen Bedingungen Eichkurven für das Verfahren zu erstellen.

- 1,5 ml umfassende RNA-Standardlösungen in SDS-haltigem Elutionspuffer (50 - 500 µg RNA-Gehalt) wurden mit 1,5 ml Orcin-Reagenz versetzt und 40 Min. bzw. 60 Min. im Wasserbad bei 85 °C inkubiert. Zusätzlich wurde noch eine Probe mitgeführt, die 500 µg RNA und 1 mg Rinderserumalbumin enthielt, um eventuelle störende Interaktionen durch die Anwesenheit von Protein zu erkennen.
- 1,5 ml umfassende RNA-Standardlösungen in SDS-freiem bzw. SDS-haltigem Elutionspuffer wurden mit 1,5 ml Orcin-Reagenz versetzt und 35 Min. bei 93 °C inkubiert. Zusätzlich wurde jeweils eine Probe mitgeführt, die 500 µg RNA und 1 mg RSA enthielt.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurde die Absorption der Reaktionsansätze bei 660 nm gemessen.

2.5.5.2 Bestimmung im Eluat

Zu 1,5 ml der Eluatfraktionen wurden 1,5 ml 10 % TCA (w/v) gegeben und 15 Min. bei 90 °C inkubiert. Nach Abkühlung unter Leitungswasser erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation der Proben bei 3000 Upm (CHRIST-Zentrifuge Typ UJ-2, Osterode). 1,0 ml des klaren Überstandes wurde dann mit 0,5 ml SDS-freiem Elutionspuffer verdünnt. Nach Zugabe von 1,5 ml Orcin-Reagenz und 35 Min. Inkubation bei 93 °C wurde die Absorption bei 660 nm ausgemessen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Eichung der Chromatographiesäule

Die Trennung der Biomoleküle aus dem Cytoplasma von E.coli-Bakterien vor und nach Bestrahlung wurde mit Hilfe der Gel-filtration über Sepharose CL 2B durchgeführt. Dieses Gel wurde gewählt, weil es extrem großporig und zudem wegen seiner kovalenten Quervernetzungen chemisch sehr stabil ist, so daß es auch autoklaviert werden kann. Nach Angaben von Pharmacia-Uppsala umfaßt sein Auftrennungsvermögen für globuläre Proteine einen Molekulargewichtsbereich von 7×10^4 bis 4×10^7 Daltons. Darüberhinaus wurde von ZEICHNER und STERN (1977) auch die Auftrennung von Nucleinsäuren in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht anhand eines Sepharose-Gels der CL-Reihe beschrieben. Mit dem verwendeten Gel war also die Auflösung der z.T. sehr großen Biomoleküle des Zellinnern grundsätzlich gewährleistet.

Um aber auch unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen eine Aussage über die Trennleistung des Gels bezüglich derjenigen Inhaltsbestandteile des Cytosols machen zu können, denen in Hinblick auf die Thematik der Untersuchungen besonderes Interesse zukam, wurde zunächst eine Eichung der Chromatographiesäule mit den isolierten Substanzen jeweils bekanntem Molekulargewichtes vorgenommen.

3.1.1 Elutionsverhalten von Eichproteinen

Für die Überprüfung des Elutionsverhaltens von Proteinen erwies sich die Verwendung von Rinderserumalbumin (MG = 67 000), Ovalbumin (MG = 45 000) und Ribonuklease (MG = 13 000) als Eichsubstanzen als zweckmäßig.

Die Eichproteine wurden entweder in Form von Lösungen in reinem Bestrahlungspuffer aufgetragen oder die Protein-Puffer-Lösungen wurden zunächst noch mit 1 % SDS versetzt, 5 Min. bei 100 °C inkubiert und dann auf die Säule aufgetragen.

Wegen der großen Bedeutung des SDS für die Durchführung der vorliegenden Arbeit, soll zunächst die Wirkung dieser Substanz auf Proteine erläutert werden. Das SDS-Molekül besteht aus einer hydrophoben aliphatischen Kohlenwasserstoffkette und einem hydrophilen Anteil, der durch eine ionisierte Sulfatgruppe gebildet wird. Es weist also die strukturellen Eigenschaften eines Detergenz auf. EICHHORN (1973) berichtet anhand seiner Untersuchungen mit Lactatdehydrogenase über die Wechselwirkung dieses Detergenz mit Proteinmolekülen und die daraus resultierenden Veränderungen der Proteinstruktur. Die Faltung eines Proteins im nativen Zustand wird neben anderen Mechanismen durch hydrophobe Wechselwirkungen nichtpolarer Seitenketten stabilisiert. Durch die Anlagerung des hydrophoben Anteils des SDS werden diese hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Proteinmoleküls unterbrochen, dadurch kommt es zur Entfaltung, d.h. Denaturierung des Proteins. Die hydrophilen Anteile des gebundenen Detergenz jedoch, die ionisierten Sulfatgruppen ($-\text{SO}_4^{--}$), sind, von der Peptidkette nach außen gewandt, dem Lösungsmittel ausgesetzt. Dadurch erscheinen alle Proteinmoleküle einheitlich negativ geladen. Im Gegensatz zur Faltung der einzelnen Polypeptidketten werden die Untereinheiten eines Proteins durch elektrostatische Wechselwirkungen heteropolarer Ionenpaare zusammengehalten. Sobald nun die durch das SDS bedingten negativen Ladungen der Untereinheiten deutlich überwiegen, führt dies zur elektrostatischen Abstoßung, das bedeutet, zur Dissoziation der Untereinheiten. Dieser Effekt tritt bereits bei Einwirkung von 1,4 g SDS pro Gramm Protein in maximalem Ausmaß auf.

In den in der vorliegenden Arbeit zur Eichung der Säule aufgetragenen Proteinlösungen betrug das Massenverhältnis SDS/Protein 10 : 1. Dabei ist zu bedenken, daß nur freie SDS-Monomere an Protein gebunden werden. Die Konzentration an freien Monomeren aber kann bei einer bestimmten Ionenstärke und Temperatur der Lösung durch Erhöhung der Gesamtkonzentration an SDS über einen gewissen Höchstwert hinaus nicht mehr gesteigert werden; ist dieser Höchstwert bereits erreicht, so wird weiter zugeführtes SDS in Micellen eingebaut, die nicht zur Proteinbindung beitragen können (REYNOLDS u. TANFORD, 1970). Dies bedeutet für das hier angewandte Konzentrationsverhältnis SDS/Protein, daß die zugeführte Menge an SDS möglicherweise unnötig groß ist, d.h. daß die maximale Wirkung des SDS auf das Protein schon bei einem niedrigeren Massenverhältnis erzielt werden könnte. Wird aber ein maximaler Effekt des SDS erreicht, so müßten die einzelnen Proteinketten infolge der negativen Ladungen an ihrer Außenseite und der dadurch verursachten gegenseitigen Abstoßung einheitliche Stäbchenform annehmen. Da die gelchromatographische Auftrennung der Eichproteine einzig aufgrund ihres Molekulargewichtes erfolgt (siehe unten), darf davon ausgegangen werden, daß sie nach Einwirkung der angewandten Menge SDS tatsächlich eine einheitliche Form aufweisen.

Bei der Gelfiltration der Eichproteine nach deren Behandlung mit SDS und Ausmessung der Extinktionen der Fraktionen bei 280 nm (ohne Abb.) findet man, daß das Rinderserumalbumin mit einem Elutionsvolumen (V_e) von 439 ml zuerst eluiert wird. Schon unmittelbar darauf folgt der Peak vom Ovalbumin ($V_e = 446$ ml). Etwas besser abgegrenzt, mit einem Elutionsvolumen von 472 ml, erscheint schließlich die Ribonuklease. Man erkennt, daß die Elutionsvolumina der Proteine sehr nahe beieinander liegen, d.h. es erfolgt nur eine schlechte Trennung. Die Poren des Gels sind also zu

groß, um eine klare Auflösung von Substanzen mit derartig geringen Molekulargewichtsunterschieden zu ermöglichen.

Dennoch wird deutlich, daß die Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht eluiert werden, daß also das Elutionsverhalten der Proteine unter den angewandten Bedingungen mit ihrem jeweiligen Molekulargewicht in Korrelation steht. Trägt man die logarithmischen Werte der Molekulargewichte gegen das Elutionsvolumen auf (Abb. 3), so zeigt sich, daß die drei Eichpunkte nahezu auf einer Geraden liegen. Es besteht offensichtlich eine lineare Beziehung zwischen dem Elutionsverhalten der verwendeten Eichproteine und den Logarithmen ihrer Molekulargewichte.

Zum Vergleich ist in der Abbildung auch eine Eichgerade dargestellt, die durch Chromatographie der Proteine ohne Vorbehandlung mit SDS erstellt werden konnte. Diese verdeutlicht, daß die Separationsvolumina zwischen den einzelnen Eichproteinen bei beiden Verfahren gleich groß sind (identische Steigungen der Geraden). Da aber auch ohne SDS eine Korrelation zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen gefunden wurde, müssen diese Proteine in ihrer äußeren Form sehr ähnlich sein.

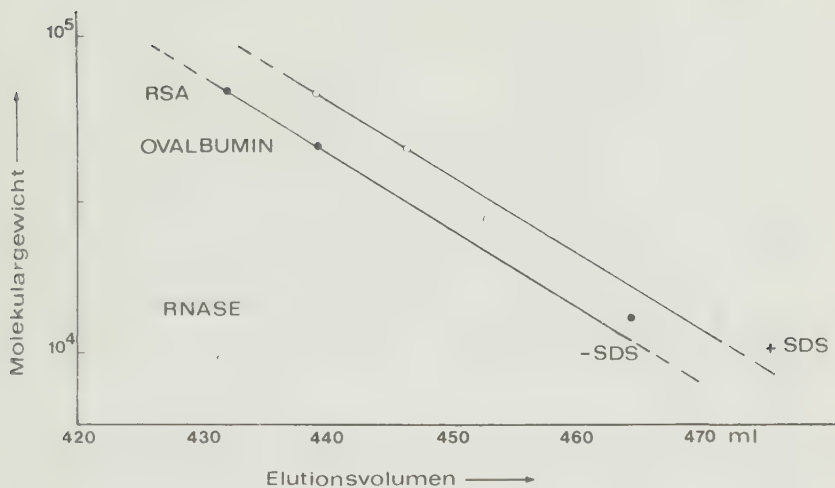


Abb. 3: Molekulargewichtseichung der mit Sepharose-Gel CL 2B gefüllten Säule (2 cm x 100 cm). Als Eichsubstanzen dienten Rinderserumalbumin (RSA), Ovalbumin (OVA) und Ribonuklease (RNASE). Zur Gewinnung der eingetragenen Werte siehe Text.

3.1.2 Elutionsverhalten von Nucleinsäuren

Das chromatographische Verhalten hochmolekularer Nucleinsäuren konnte mittels isolierter DNA ($MG = 1 - 2 \times 10^7$) und einem Gemisch aus 16-s-ribosomaler-RNA ($MG = 550\ 000$) und 23-s-ribosomaler-RNA ($MG = 1,1 \times 10^6$) überprüft werden. Durch die Chromatographie der DNA war es gleichzeitig möglich, das Ausschlußvolumen V_0 zu bestimmen.

Die Nucleinsäuren wurden für die Gelfiltration jeweils in dem gleichen Puffer gelöst, der später auch bei der Bestrahlung verwendet wurde, die Lösungen wurden dann mit 1 % SDS versetzt und 5 Min. bei 100 °C inkubiert. Als Elutionsmittel wurde 2×10^{-2} M Phosphatpuffer, dem 0,5 % SDS zugesetzt war, verwendet. Die Ausmessung der Extinktion in den Eluatfraktionen erfolgte bei 260 nm.

In Abb. 4 sind die Chromatogramme der Nucleinsäuren dargestellt. Die Elution der DNA beginnt nach einem Elutionsvolumen von 160 ml. In Anbetracht des hohen Molekulargewichtes dieser Substanz, welches knapp jenseits der Ausschlußgrenze des Gels liegt, entspricht dieser Wert dem Ausschlußvolumen V_0 . Nach sehr steilem Anstieg der Kurve findet sich bei einem Elutionsvolumen von 181 ml das Extinktionsmaximum.

Deutlich später erscheint die Elutionskurve des Gemisches von 23-s- und 16-s-ribosomaler-RNA aus E.coli. Dieses Chromatogramm nimmt den Verlauf einer Schulterkurve, wobei der erste Anteil wohl der 23-s-rRNA zuzuschreiben ist, der zweite Anteil mit einem Extinktionsmaximum bei 381 ml der 16-s-rRNA. Offensichtlich ist der Molekulargewichtsunterschied der beiden rRNA-Arten nicht ausreichend groß, um eine klare Trennung durch das Gel zu ermöglichen. Hervorzuheben ist jedoch, daß die Molekulargewichte der Ribonucleinsäuren deutlich innerhalb der Ausschlußgrenze liegen, womit deren Abgrenzung gegenüber der DNA gewährleistet ist. Ferner zeigt sich bei einem Vergleich des Chromatogramms mit dem Elutionsverhalten der

Eichproteine, daß die Ribonucleinsäuren (V_e für 16-s-rRNA = 381 ml) gut gegenüber den Proteinen mit einem maximalen Molekulargewicht von 67 000 (RSA) abgrenzbar sind (V_e für RSA = 439 ml).

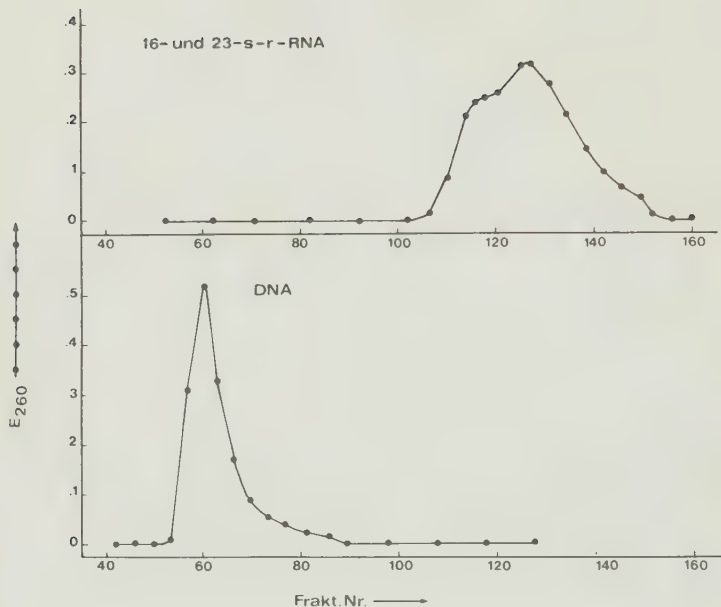


Abb. 4: Chromatogramme von Nucleinsäuren mit jeweils bekanntem Molekulargewicht.
Die Nucleinsäuren DNA, 23-s-rRNA und 16-s-rRNA wurden in 1×10^{-2} M Phosphatpuffer gelöst. Die Chromatographie erfolgte nach Zusatz von 1 % SDS und 5-minütiger Inkubation bei 100 °C. Die Messung der Extinktion geschah bei 260 nm.

3.2 Chromatographische Auftrennung der löslichen Bestandteile des nativen Cytosols

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der Gelfiltration von nativem und bestrahltem Cytosol aus E.coli-Zellen zu untersuchen, ob nach Röntgenbestrahlung von intakten Bakterien bzw. von isoliertem Cytosol Veränderungen der Zellproteine erkennbar werden, die Rückschlüsse auf die etwaige Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren unter Bestrahlung zulassen. Dazu war es zunächst erforderlich, einen hinreichenden Eindruck vom Elutionsverhalten des unbestrahlten isolierten Zellinhalts zu gewinnen.

Für die Gewinnung des Cytosols standen zwei Methoden zur Verfügung, der enzymatische Zellaufschluß mittels Lysozym und der mechanische Aufschluß durch Ultraschalleinwirkung, deren Durchführung bereits ausführlich beschrieben wurde (siehe "Material und Methoden"). Beiden Verfahren ist gemeinsam, daß sie zur Isolierung der löslichen Bestandteile des Zellinnern führen; die in Wasser unlöslichen Bestandteile, v.a. die Zellmembranen, werden vor der Gelfiltration entfernt.

Die Extinktion des Chromatographieeluates wurde bei 260 nm ausgemessen. Bei dieser Wellenlänge wird die Absorption zwar überwiegend durch Nucleinsäuren hervorgerufen, zu einem geringen Teil aber auch durch Proteine. Deshalb wurde in den Eluatfraktionen zusätzlich die Proteinbestimmung nach WANG und SMITH durchgeführt, die eine bei 500 nm auszumessende Färbung ergibt.

Der Aufschluß der Bakterien geschah zunächst unter Anwendung der enzymatischen Methode mit Lysozym (Abb. 5). Die Gelfiltration ergab eine Auftrennung in drei Hauptkomponenten. Das erste Extinktionsmaximum erscheint im Ausschlußvolumen und kann der DNA zugeschrieben werden. Im Bereich der Fraktionen 105 bis 150 erhält man eine Schulterkurve mit einem Maximum

bei Fraktion 126 ($V_e = 378$ ml). Der Vergleich mit den in Abb. 4 dargestellten Eichchromatogrammen von Nucleinsäuren zeigt, daß es sich hierbei um die 23-s- und 16-s-ribosomale-RNA handelt. Der dritte Anteil der Elutionskurve ist durch das Erscheinen kleinerer Nucleinsäuren und der Zellproteine bedingt. Letzteres wurde durch die kolorimetrische Proteinbestimmung bestätigt, die durch den eingipfeligen Verlauf außerdem erkennen läßt, daß die Zellproteine nur als Gesamtheit eluiert werden, d.h. daß sie keine für das Auflösungsvermögen des Gels ausreichenden Molekulargewichtsunterschiede aufweisen, um deutlich gegeneinander abgrenzbar zu sein.

Führt man die Zell-Lyse durch Einwirkung von Ultraschallwellen durch, so steigt die Gesamtausbeute an UV-absorbierendem Material sehr stark an. Jedoch reduziert sich das Chromatogramm durch das Verschwinden des DNA-Peaks auf zwei Hauptanteile. Durch eine kolorimetrische DNA-Bestimmung im Zell-Lysat (siehe 2.5.2) konnte festgestellt werden, daß sich auch nach der Ultraschall-Lyse die DNA in der Fraktion der löslichen Zellbestandteile befindet. Da sie aber im Chromatogramm nicht als gesonderter Peak in Erscheinung tritt, wie es bei der Lysozym-Lyse der Fall ist, kann angenommen werden, daß unter den angewandten Bedingungen des mechanischen Zellaufschlusses das Bakterienchromosom in Bruchstücke zerschlagen wird, die sich bei der Gelfiltration je nach Restmolekulargewicht auf das gesamte Eluat verteilen.

Die Elutionskurve, die man bei der Proteinbestimmung erhält, ist ähnlich wie bei der Chromatographie nach der Lysozym-Lyse.

Wie bereits erwähnt, wurde bei Anwendung der enzymatischen Lyse-Methode eine wesentlich geringere Ausbeute an UV-absorbierenden Substanzen erzielt als durch die Ultraschall-

einwirkung. Dies wird bereits bei einem Vergleich der beiden Elutionskurven in Abb. 5 deutlich. Die Ausbeute an UV-absorbierendem Material läßt sich aufgrund der Extinktionsmessung bei 260 nm quantitativ bestimmen. Die Ermittlung dieses Wertes erfolgte vor dem Auftragen der Probe auf die Gelsäule. Dabei fand sich, daß nach Ultraschall-Lyse die Extinktion des nativen Cytosols jedesmal exakt 1,18 betrug. Nach der Lysozym-Lyse jedoch variierte die gemessene Extinktion zwischen 0,27 und 0,33; als Durchschnittswert ließ sich die Extinktion von 0,30 errechnen. Man erkennt aufgrund dieses Parameters unter anderem, daß die UV-Absorption nach Ultraschalleinwirkung ca. vier mal größer ist als nach Lysozymeinwirkung. Dieser Befund wird später noch diskutiert.

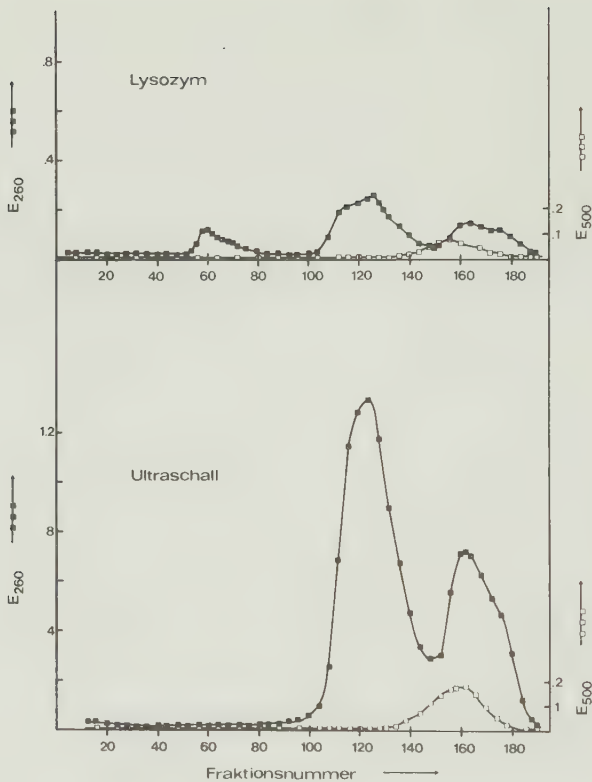


Abb. 5: Auftrennungen von Cytosol aus unbestrahlten E.coli-Bakterien über CL-Sepharose 2B (2 cm x 100 cm). Vor dem Auftragen wurde das verdünnte Cytosol mit SDS auf 1 % eingestellt und 5 Min. bei 100 °C inkubiert. Die Elution erfolgte mit 2×10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7, der 0,5 % SDS enthielt. Das Cytosol wurde aus E.coli-Bakterien durch Einwirkung von Lysozym bzw. Ultraschall gewonnen.

3.3 Ribonucleinsäurebestimmung im Chromatographieeluat

Das Hauptinteresse der vorliegenden Untersuchungen gilt dem chromatographischen Verhalten der Proteine und Nucleinsäuren des Zellinnern von E.coli-Bakterien vor und nach Röntgenbestrahlung unter verschiedenen definierten Bedingungen. Als Grundlage für die Erstellung der entsprechenden Chromatogramme diente die Bestimmung der Extinktion bei 260 nm. Da bei dieser Wellenlänge zwar hauptsächlich Nucleinsäuren und zum geringen Teil auch Proteine absorbieren, aber möglicherweise auch noch andere Zellinhaltsbestandteile störend interferieren, sollte neben der chemischen Proteinbestimmung auch ein spezifischer quantitativer Nachweis der Nucleinsäuren im Eluat durchgeführt werden. Dazu wurde die chemische Nachweismethode für Ribonucleinsäuren mittels Orcinreagens erprobt, das in geringem Maß auch mit DNA reagiert. Das Reaktionsprodukt ergibt eine Färbung, die photometrisch bei 660 nm ausmeßbar ist (siehe auch "Material und Methoden").

3.3.1 Eichkurven der Nachweismethode

Das auf die Chromatographiesäule aufgetragene Cytosol sowie das Elutionsmittel enthielten in einer Konzentration von 1 % bzw. 0,5 % das Detergenz SDS. Die Durchführung der kolorimetrischen Bestimmungsmethode in Anwesenheit dieser Substanz ist noch nicht beschrieben. Deshalb wurden zunächst Eichkurven für das Verfahren unter verschiedenen Bedingungen erstellt. Zu diesem Zweck wurde aus Hefe isolierte RNA entweder in 0,5 % SDS-haltigem oder SDS-freiem Elutionspuffer gelöst. Nach Zusatz des Orcinreagens zu den einzelnen Standardlösungen erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlicher Dauer. Neben

den reinen RNA-Lösungen wurde jeweils eine Probe mitgeführt, die RNA und Rinderserumalbumin enthielt. Die Werte dieser Proben wurden bei der Berechnung der Eichkurven nicht einbezogen.

Die in Abb. 6 dargestellten Diagramme ergaben sich nach 40- bzw. 60-minütiger Inkubation der SDS-haltigen Reaktionsansätze bei 85 °C.

Die Abb. 7 zeigt die Ergebnisse, die nach 35-minütiger Inkubation bei 93 °C ermittelt wurden, wobei die Reaktionsansätze SDS enthielten bzw. frei von SDS waren.

Aus den genannten Darstellungen und aus Tab. I kann das Folgende ersehen werden:

- In allen vier Fällen läßt sich durch die Meßpunkte eine Gerade mit positiver Steigung legen, d.h. die gemessene Extinktion ist der Konzentration an RNA direkt proportional, das Lambert-Beer'sche Gesetz scheint zumindest bis zu einer Menge von 500 µg RNA zu gelten. Vergleicht man jedoch die Streuung der Eichpunkte um die errechneten Geraden, so erkennt man - besonders in Abb. 7 -, daß bei den Bestimmungen in Anwesenheit von SDS stärkere Abweichungen auftreten als bei der Bestimmung ohne SDS. Obgleich die in der Tabelle I angegebenen Werte für alle vier Geraden eine recht gute Korrelation beweisen, ist dennoch zu beachten, daß die Korrelationskoeffizienten bei den Bestimmungen mit SDS durchweg niedriger liegen als bei der Bestimmung ohne SDS. Daraus kann geschlossen werden, daß beim Nachweis der RNA in Gegenwart von SDS mehr oder weniger unvermeidbare zufällige Fehler eine größere Rolle spielen als in Abwesenheit von SDS. Wahrscheinlich hängt dies mit der bei der Bestimmung in Gegenwart von SDS gemachten Beobachtung zusammen,

daß sich an der Oberfläche der Reaktionsansätze anscheinend zufallsabhängig "ölartige Tropfen" unterschiedlicher Größe und mit stärkerer Farbintensität als die übrige Lösung bildeten.

- Wie aus Abb. 6 und der Tabelle I ersichtlich, wird der Anstieg der Geraden mit zunehmender Inkubationsdauer steiler, das bedeutet, die Farbintensität nimmt mit der RNA-Menge zu. Wesentlicher für die Zunahme der Färbung scheint jedoch die Erhöhung der Inkubationstemperatur zu sein. So weist die in Abb. 7 aufgezeichnete Gerade unter den Eichgeraden, die durch die Bestimmung mit SDS erstellt sind, die größte Steigung auf, obwohl die Inkubationsdauer nur 35 Min., die Temperatur jedoch 93 °C beträgt. Ein noch steilerer Anstieg bei gleicher Inkubationsdauer und -temperatur findet sich bei der Geraden, die auf dem Nachweis in Abwesenheit von SDS beruht.
- Die Extinktionswerte der Reaktionsansätze, die neben der RNA noch Rinderserumalbumin enthielten, liegen bei den Bestimmungen mit SDS unterhalb der Werte, welche bei den Proben mit bloßer RNA gemessen wurden. Bei der Bestimmung ohne SDS liegt dieser Wert oberhalb der Extinktion der reinen RNA-Lösung.

Zusammenfassend lassen sich aus den durch die Erstellung der Eichgeraden gemachten Feststellungen folgende Schlußfolgerungen ziehen:

Die kolorimetrische Nachweismethode von Ribonucleinsäuren mit Hilfe der Orcin-Reaktion läßt auch in Anwesenheit des Detergenz SDS die quantitative Bestimmung von RNA in reiner Lösung mit hinreichender Genauigkeit zu. Jedoch scheinen gewisse störende Interaktionen durch das SDS hervorgerufen zu werden.

So bilden sich bei Abkühlung der Reaktionsansätze nach der Inkubation im Wasserbad an der Oberfläche der Probenflüssigkeit "ölartige Tropfen" wechselnder Größe und stärkerer Farbintensität als die der übrigen Lösung aus.

Die Färbung ist bei der Bestimmung mit SDS deutlich geringer als beim Nachweis ohne SDS, ein Effekt, der durch das Vorhandensein von Protein offensichtlich noch verstärkt wird.

Die schwächere "Anfärbbarkeit" der RNA in Anwesenheit von SDS kann möglicherweise durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden.

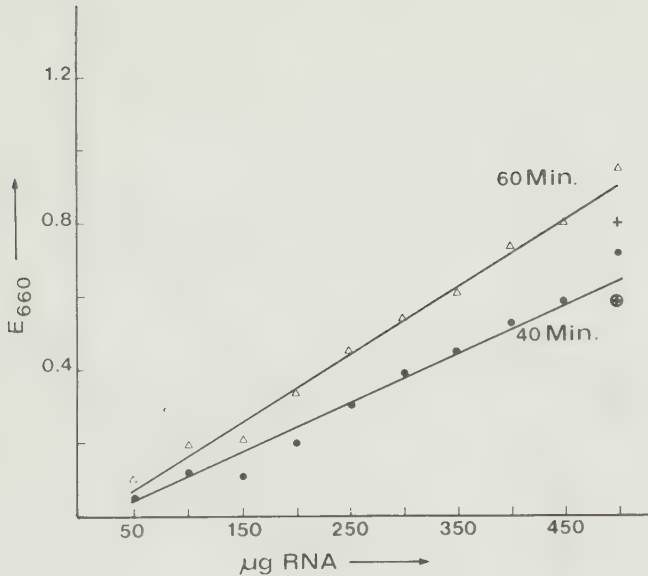


Abb. 6: Eichgeraden für die Ribonucleinsäurebestimmung mit Hilfe der Orcin-Reaktion in Anwesenheit von SDS. Aus Hefe isolierte RNA wurde in 2×10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7, der 0,5 % SDS enthielt, gelöst. Nach Zusatz des Orcin-Reagens erfolgte eine Inkubation der Reaktionsansätze bei 85 °C von 40- bzw. 60-minütiger Dauer. Die Extinktion wurde nach Abkühlung unter Leitungswasser bei 660 nm bestimmt.

⊕ und +: Diese Proben enthielten zusätzlich 1 mg Rinderse-
rumalbumin

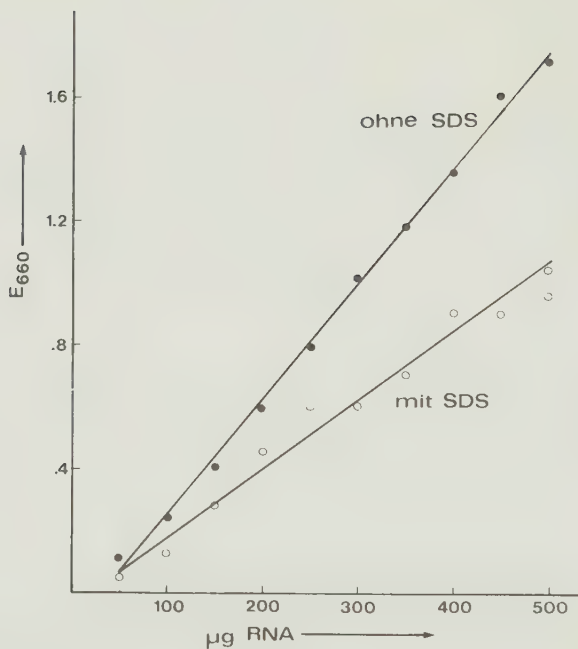


Abb. 7: Eichgeraden für die RNA-Bestimmung mittels Orcin-Reagens in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von SDS.
Aus Hefe isolierte RNA wurde in 2×10^{-2} M Phosphatpuffer gelöst, dem 0,5 % SDS zugesetzt war ("mit SDS") bzw. in gleichem, SDS-freiem Puffer ("ohne SDS"). Nach Zusatz von Orcin-Reagens erfolgte eine 35-minütige Inkubation im Wasserbad bei 93°C . Nach Abkühlung unter Leitungswasser wurde die Extinktion bei 660 nm ausgemessen.

Bedingungen der Bestimmung			Werte der Eichgeraden		
SDS (0,5 %)	Temp. (°C)	Inkub.-Zeit (Min.)	m	b	r
+	85	40	0,00135	- 0,02982	0,99489
+	85	60	0,00187	- 0,02460	0,99509
+	93	35	0,00223	- 0,04189	0,98580
-	93	35	0,00369	- 0,11499	0,99845

Tabelle I: Werte der Eichgeraden für die RNA-Bestimmung mittels Orcin-Reagens unter verschiedenen Bedingungen.

m: Steigung der Geraden

b: Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate

r: Korrelationskoeffizient der Geraden

Für weitere Erläuterungen siehe Text.

3.3.2 RNA-Bestimmung im Eluat nach der Gelfiltration von Cytosol

Aufgrund der Resultate, die bei der Erstellung der Eichgeraden für die Nachweismethode von Ribonucleinsäuren mit Hilfe von Orcinreagens gewonnen wurden, schien es möglich, dieses Verfahren wie bereits erwähnt, auch in Anwesenheit von SDS anzuwenden. Deshalb wurde der Versuch unternommen, nach der Chromatographie von durch Einwirkung von Lysozym gewonnenem Cytosol den RNA-Gehalt in den Eluatfraktionen zu bestimmen. Das Vorgehen hierbei ist bereits in 2.5.5.2 erläutert. Da aufgrund des Lyseverfahrens und der anschließenden Gelfiltration in den zur RNA-Bestimmung herangezogenen Fraktionen nur noch RNA und z.T. Proteine zu erwarten waren, erschien die Säurehydrolyse in der Hitze zur weiteren Isolierung der Nucleinsäuren im Eluat als ausreichend. Damit konnte eventuell vorhandenes Protein ausgefällt und durch Abzentrifugation entfernt werden. Um störende Interaktionen durch das SDS auf ein Minimum zu reduzieren, wurde der klare Überstand, in dem sich die säurelöslichen Oligonucleotide der RNA befinden mußten, mit SDS-freiem Elutionspuffer verdünnt. Nach Zugabe von Orcinreagens zu dieser Verdünnung und 35-minütiger Inkubation bei 93 °C erfolgte das Ausmessen der Extinktion bei 660 nm. Hierbei fanden sich von den Fraktionsnummern anscheinend völlig unabhängige Werte, die größtenteils im negativen Bereich oder in der Umgebung des Nullwertes liegen (ohne Abb.). Daraus wurde gefolgert, daß die RNA möglicherweise durch die störende Wirkung des SDS und die zusätzliche Verdünnung des Eluats mengenmäßig unter der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode lag.

Bei einem weiteren Versuch wurde die Verdünnung der Eluatfraktionen mit SDS-freiem Puffer verzichtet, um die RNA-Konzentration in den Proben nicht zu erniedrigen. Aber auch dies führte nur zu ähnlichen Ergebnissen.

Durch Zusatz eines organischen Lösungsmittels (Propanol) nach der Inkubation gelang es, die bereits beschriebenen "ölartigen Tropfen" in den Reaktionsansätzen aufzulösen, wovon eine Verringerung des SDS-Einflusses erhofft wurde. Die danach gemessenen Extinktionswerte waren zwar wesentlich höher als zuvor, zeigten aber ebenso keinen Zusammenhang mit den Fraktionsnummern.

Wegen dieser Schwierigkeiten und in Anbetracht des relativ großen Zeitaufwandes, der zu ihrer Behebung erforderlich gewesen wäre, wurden weitere Versuche der RNA-Bestimmung im Eluat unterlassen.

3.4 UV-Absorptionsspektren des Cytosols

Die Versuche, deren Resultate bisher dargestellt und erläutert wurden, erfolgten alle an unbestrahlten Substanzen und dienten zur methodischen Vorbereitung der Untersuchungen an bestrahltem Zellmaterial. Als Hauptverfahren zur Überprüfung von strahleninduzierten Veränderungen der Inhaltsbestandteile von E.coli-Zellen sollte die Auftrennung durch Gelfiltration angewendet werden. Um bereits vor dem Auftragen des bestrahlten Materials auf die Chromatographiesäule einen ersten Anhalt für Strahleneffekte zu erhalten und eventuell eine sinngemäße Bestätigung der durch die Gelfiltration erzielbaren Ergebnisse zu ermöglichen, erfolgte nach jeder Bestrahlung auch die Aufzeichnung eines Absorptionsspektrums des Cytosols im UV-Bereich; denn durch Röntgenstrahlung hervorgerufene Veränderungen des Absorptionsspektrums (360 - 240 nm) mußten zwangsläufig auch auf Alterationen der absorbierenden Zellinhaltsbestandteile - in diesem Wellenlängenbereich überwiegend Nucleinsäuren und Proteine - hinweisen.

Zur Aufnahme des Spektrums wurde ein geringer Teil des bestrahlten und mit 1 % SDS versetzten Cytosols im Verhältnis

1 : 10 mit Elutionspuffer verdünnt und gegen den gleichen Puffer als Leerwert ausgemessen. Um die tatsächlichen Extinktionswerte zu erhalten, die aus den Abbildungen zu entnehmen sind, wurden die gemessenen Werte mit dem Faktor 10 multipliziert.

Zunächst war es auch hierbei nötig, die Kontrollkurve des unbestrahlten Cytosols aufzunehmen (Abb. 8 und 9: "nativ"). In dieser Kurve findet man den Beginn einer merklichen Absorption bei 310 nm, das Extinktionsmaximum bei 260 nm. Hier absorbieren bei neutralem pH hauptsächlich die Purinbase Adenin und auch die übrigen Basen der Nucleinsäuren. Oberhalb der Wellenlänge 310 nm ist also keine Absorption durch das unbestrahlte Cytosol erkennbar.

Nach Bestrahlung intakter Bakterien unter Stickstoff (Abb. 8a und b) zeigt sich dagegen eine Erhöhung der Extinktion bei 320 nm in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis. Hierbei ist noch zu beachten, daß in den beiden Kurven, die nach Applikation von 6×10^4 Gy bei 2 °C bzw. 37 °C entstanden, die Extinktionswerte bei 320 nm zwar nahezu gleich sind, der Kurvenanstieg nach Bestrahlung bei 2 °C jedoch steiler verläuft, so daß hier z.B. bei der Wellenlänge 310 nm ein höherer Extinktionswert erreicht ist als in der anderen Kurve. Diese Extinktionserhöhung findet sich auch - sogar in ausgeprägterem Maße - nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf primär isoliertes Cytosol bei 2 °C (Abb. 9). Hier erkennt man, daß zumindest nach Applikation der Maximaldosis unter Stickstoff (Abb. 9a) bei 320 nm eine stärkere Absorption erfolgt als nach entsprechender Bestrahlung unter Luft (Abb. 9b). Da es keine chromophoren Gruppen gibt, die in diesem Bereich merklich absorbieren, kann nach Ansicht mancher Autoren die beobachtete Extinktionserhöhung bei 320 nm nur durch verstärkte Lichtstreuung verursacht sein. Eine verstärkte Lichtstreuung aber läßt darauf schlies-

sen, daß durch Einwirkung von Röntgenstrahlung auf intakte E.coli-Bakterien bzw. auf isoliertes Cytosol dieser Bakterien größere Moleküle entstanden sind. Des weiteren ersieht man aus den graphischen Darstellungen, daß nach Bestrahlung unter Stickstoff die Extinktion im gesamten Wellenlängenbereich mit zunehmender Dosis ansteigt (Abb. 8 und 9a). Dies ist wiederum auf die vermehrte Lichtstreuung zurückzuführen. Ein anderes Verhalten weisen die Absorptionsspektren auf, welche nach Bestrahlung unter Luft aufgezeichnet wurden (Abb. 9b). Zwar ist auch bei diesen Kurven im Anfangsteil der Effekt der verstärkten Lichtstreuung deutlich erkennbar, d.h., die Extinktionswerte sind größer als die Werte in der Kontrollkurve, jedoch schneiden sie in ihrem weiteren Verlauf bevor die Wellenlänge 260 nm erreicht ist die Letztere, um sich dann in etwa bis zur Wellenlänge 250 nm unterhalb dieser zu bewegen. Dabei scheint der Schnittpunkt bei einer um so größeren Wellenlänge zu liegen und die Werte im nachfolgenden Kurvenanteil scheinen um so niedriger zu sein, je höher die angewandte Strahlendosis ist. Erklärbar ist dieses Phänomen durch die strahleninduzierte Zerstörung von Gruppen, die im Bereich von 260 nm absorbieren, also u.a. von Nucleinsäurebasen.

Die Röntgenbestrahlung unter Luft (O_2) führt folglich zum Auftreten zweier Konkurrenzreaktionen. Die eine bedingt die Zerstörung von Nucleinsäurebasen, wodurch die UV-Absorption abnimmt; die zweite Reaktion führt zur Entstehung größerer Moleküle, die eine Zunahme der Extinktion durch Streuung verursachen.

Möglich, daß auch bei Bestrahlung unter Stickstoff beide Reaktionen eine Rolle spielen. Zu beweisen ist dies anhand der Absorptionsspektren nicht, da es nicht möglich war, den durch die Lichtstreuung hervorgerufenen Anteil an der Extinktion bei 260 nm zu errechnen und die tatsächliche Absorption zu ermitteln.

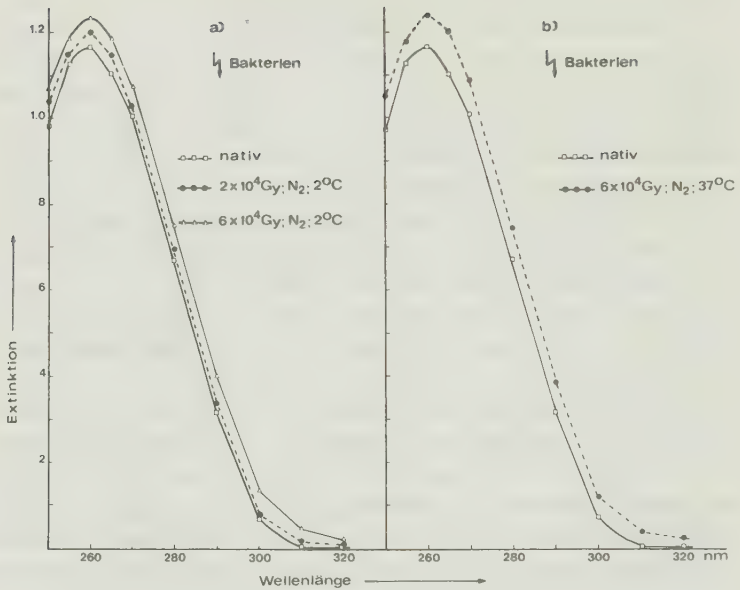


Abb. 8: UV-Spektren von nativem und nach Bestrahlung intakter Bakterien gewonnenem Cytosol.

Das mit 1 % SDS versetzte Cytosol wurde gegen 2×10^{-2} M Phosphatpuffer, der 0,5 % SDS enthielt, ausgemessen. Die angewandten Bestrahlungsbedingungen sind in der Abbildung angegeben.

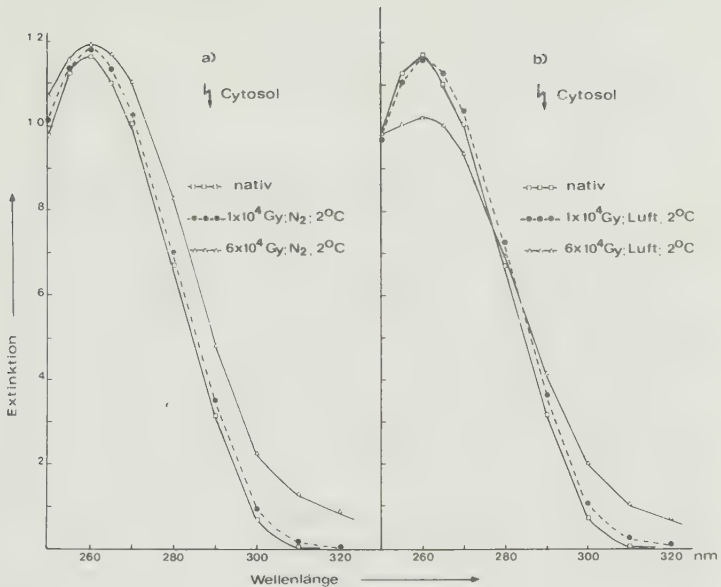


Abb. 9: UV-Spektren von nativem und bestrahltem Cytosol.

Die UV-Absorption des Cytosols wurde nach Zusatz von 1 % SDS ausgemessen. Als Leerwert diente 2×10^{-2} M Phosphatpuffer, der 0,5 % SDS enthielt.

Die jeweiligen Bedingungen, unter denen das isolierte Cytosol bestrahlt wurde, sind aus der Abbildung zu ersehen.

3.5 Chromatographische Auftrennung der löslichen Zellinhaltsbestandteile nach Bestrahlung

Die strahleninduzierten Veränderungen im Cytosol von E.coli-Bakterien, die sich mit Hilfe der Gelfiltration feststellen lassen, wurden untersucht

- nach Bestrahlung von intakten E.coli-Bakterien aus der stationären Wachstumsphase,
- nach Bestrahlung von intakten E.coli-Bakterien, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und
- nach Bestrahlung des isolierten Cytosols von Bakterien aus der stationären Wachstumsphase.

Obwohl für den Aufschluß der Bakterien zwei Methoden zur Verfügung standen, erhielt die Lyse durch Einwirkung von Ultraschallwellen wegen ihrer besseren Durchführbarkeit und größeren Effektivität in den im folgenden dargestellten Versuchen den Vorzug vor der Lysozym-Lyse.

Um bei der chromatographischen Auftrennung etwaige Adsorptionseffekte durch das Gel weitestgehend auszuschließen und zudem die Auswirkung von Strukturunterschieden der Proteine auf ihr Elutionsverhalten auszuschalten, wurde das Cytosol mit Natriumdodecylsulfat versetzt; ebenso erfolgte die Elution der Proben mit SDS-haltigem Puffer. Denn wie bereits in 3.1.1 beschrieben, erreicht man durch die Gegenwart von SDS eine einheitliche Molekülform und eine stark negative Ladung bei allen Proteinen. Somit war die Auflösung der Zellinhaltsbestandteile in strenger Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht gewährleistet. Eine weitere erwünschte Wirkung des SDS war, daß es sowohl elektrostatische wie auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Molekülen aufhebt. Dies war für die vorliegende Arbeit ein wesentlicher Aspekt, da hierbei nur die strahlenbedingte Ausbildung kovalenter Bindungen von Interesse war.

Das fraktionierte Eluat wurde spektralphotometrisch bei 260 nm ausgemessen. Zusätzlich erfolgte in den eluierten Fraktionen die Proteinbestimmung nach WANG und SMITH (1975). Diese Methode ergibt eine bei 500 nm auszumessende Färbung.

3.5.1 Gelfiltration nach Bestrahlung intakter Bakterien in der stationären Wachstumsphase

Zunächst erfolgte die chromatographische Auftrennung von Cytosol, das nach Röntgenbestrahlung intakter Bakterien in der Ruhephase isoliert wurde.

Dazu wurden die Bakterienkulturen gewaschen und für die Bestrahlung in 4 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Die absorbierte Dosis betrug jeweils 2, 4 bzw. 6×10^4 Gy, wobei unter N_2 bzw. Luft bei 2 °C bzw. 37 °C bestrahlt wurde. Die bestrahlten Zellen wurden anschließend lysiert, Zellhüllen und wasserunlösliche Bestandteile des Zellinnern entfernt und die löslichen Anteile des Cytoplasmas aus das Gel aufgetragen. Nach Elution und Bestimmung der Extinktion der einzelnen Fraktionen erhielt man die in den Abbildungen 10 und 11 dargestellten Diagramme. Zur besseren Veranschaulichung sind die Elutionskurven übereinander bzw. auch nebeneinander gezeichnet.

Die Abb. 10 zeigt das Elutionsverhalten des Cytosols nach Bestrahlung unter N_2 bei 2 °C mit den jeweils angegebenen Dosen.

Betrachtet man die Kurven, die durch Absorption bei 260 nm bedingt sind, so erkennt man, daß die Auftrennung der Probe in die beiden Komponenten, die bei der Gelfiltration unbestrahltem Zellmaterials erscheinen, mit steigender Dosis in zunehmendem Maße aufgehoben wird. Einerseits kommt dies dadurch zustande, daß der erste Anteil, welcher der ribosomalen RNA entspricht, dosisabhängig immer weiter in den Bereich

größerer Elutionsvolumina wandert. Folglich muß sich das mittlere Molekulargewicht dieser Substanzen verringert haben. Andererseits führt die Erhöhung der Dosis zu einer Verlagerung der zuletzt eluierten Komponente in Richtung niedrigerer Fraktionsnummern. Ferner ist zu beobachten, daß das Extinktionsmaximum des ersten Anteils des Chromatogramms mit zunehmender Dosis abnimmt, während dajenige des zweiten Anteils ansteigt.

Aus den Proteinbestimmungskurven in der Abbildung ist zu ersehen, daß die Elution der Proteine mit steigender Dosis früher beginnt, so daß diese bereits in den Fraktionen auftreten, die die ribosomale RNA enthalten. Dies weist auf eine Zunahme des Molekulargewichtes der Proteine hin, was entweder durch Proteinaggregation oder durch die Bildung von Protein-Nucleinsäure-Komplexen erklärbar ist. Da durch die Einwirkung von SDS elektrostatische und hydrophobe Bindungen gelöst werden, muß es sich bei den Aggregaten oder Komplexen um kovalent verknüpfte Moleküle handeln.

Es kommt also durch die Einwirkung von Röntgenstrahlen sowohl zu einer Abnahme des Molekulargewichtes der Nucleinsäuren als auch zu einer Zunahme des mittleren Molekulargewichtes der Proteine.

Bestrahlt man die Bakterien mit 6×10^4 Gy unter N_2 bzw. unter Luft (O_2) bei 2 °C oder 37 °C, so ergeben sich die in Abb. 11 aufgezeichneten Elutionskurven. Die Zeichnung in Abb. 11a wurde aus der Abb. 10 übernommen. Ein Vergleich dieses Chromatogramms mit den Kurven in Abb. 11b zeigt, daß die Elution der Proteine nach Bestrahlung bei 2 °C unter sonst gleichen Bedingungen früher beginnt als nach Bestrahlung unter 37 °C, wobei jedoch die Auflösung des Cytosols insgesamt in etwa gleich aussieht. Eine nur geringe Abweichung zeigt sich darin, daß bei 37 °C das Maximum des ersten Peaks vier Fraktionen früher erscheint und auch etwas höher

ist. Bestrahlt man mit gleicher Dosis unter Luft, so verschwindet die Auftrennung in zwei Komponenten völlig. Das gesamte UV-absorbierende Material wird als ein Peak mit einem Extinktionsmaximum bei Fraktion 156 eluiert (Abb. 11c und d). Dabei ist es ohne Bedeutung, ob bei 2 °C oder 37 °C bestrahlt wurde. Eine durch die verschiedenen Bestrahlungstemperaturen bedingte Veränderung weisen dagegen wiederum die beiden Proteinbestimmungskurven auf. Auch hier beginnt die Elution der Proteine nach Bestrahlung bei 2 °C früher als nach Bestrahlung bei 37 °C.

Die Abb. 11 macht also deutlich, daß es durch Röntgenbestrahlung der Bakterien sowohl in Gegenwart von N_2 als auch von Luft zur Molekulargewichtszunahme der Proteine kommt. Nach Bestrahlung bei 37 °C ist dieser Effekt aber in beiden Fällen geringer. Ferner weist die Abbildung darauf hin, daß in Anwesenheit von Luft, d.h. Sauerstoff das Zerbrechen der Moleküle dominiert.

Um das veränderte Elutionsverhalten der Zellproteine nach Bestrahlung noch zu verdeutlichen, wurde eine halbquantitative Bestimmung des prozentualen Anteils der Proteine im Bereich der Fraktionen 100 bis 130 am Gesamtprotein durchgeführt (Tabelle II). Dieser Bereich wurde deswegen gewählt, weil sich nach Auftrennung der unbestrahlten Probe vor der Fraktion 130 nahezu kein Protein findet (1,10 %). Nach Bestrahlung jedoch nimmt der Anteil des in diesem Fraktionsbereich eluierten Proteins mit steigender Dosis in Abhängigkeit von den jeweiligen Bestrahlungsbedingungen merklich zu. Die in der Tabelle eingetragenen Werte sind um den bereits in der nativen Probe vor der Fraktion 130 erscheinenden Proteinanteil korrigiert, so daß sie der tatsächlich strahleninduziert verfrüht eluierten Proteinmenge entsprechen.

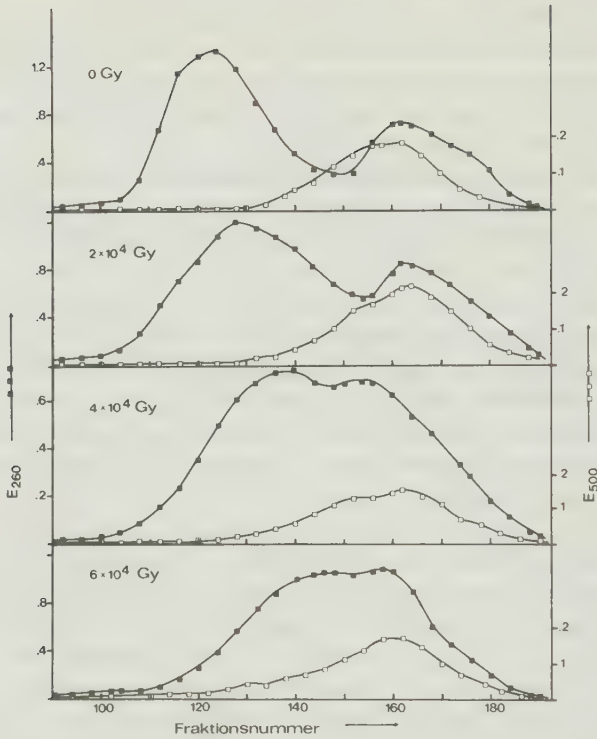


Abb. 10: Chromatographische Auftrennung des Cytosols nach Bestrahlung intakter *E.coli*-Bakterien unter N_2 .
Nach Bestrahlung der *E.coli*-Bakterien mit den Dosen 0, 2×10^4 , 4×10^4 bzw. 6×10^4 Gy bei 2 °C in N_2 -Atmosphäre und Isolierung des Cytosols wurde die Probe im Sepharose-Gel CL 2B mit 0,5 % SDS-haltigem Puffer chromatographiert. Das fraktionierte Eluat wurde photometrisch bei der Wellenlänge 260 nm ausgemessen. Zusätzlich erfolgte eine kolorimetrische Proteinbestimmung, bei der bei 500 nm ausgemessen wurde.

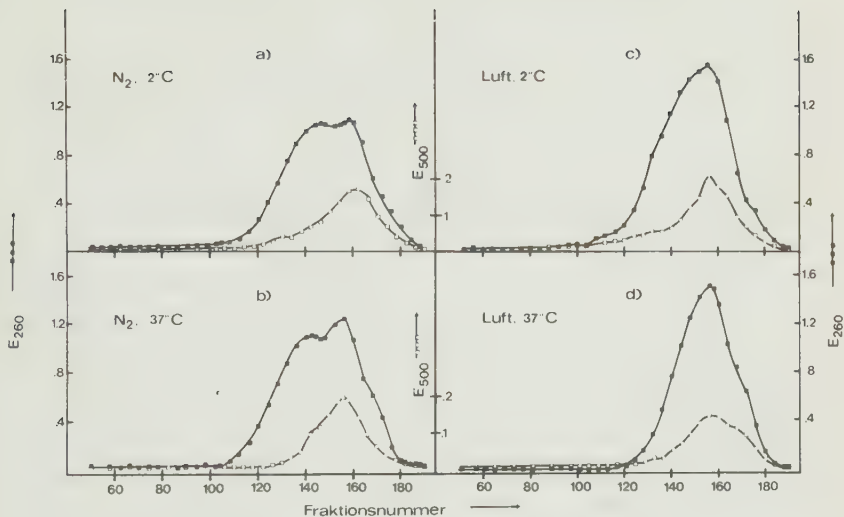


Abb. 11. Chromatogramme des Cytosols nach Bestrahlung intakter Bakterien unter verschiedenen Atmosphären und bei verschiedenen Temperaturen.

Die *E.coli*-Bakterien wurden mit 6×10^4 Gy unter N₂ bzw. Luft (O₂) bei 2 °C bzw. 37 °C bestrahlt. Das anschließend isolierte Cytosol wurde im Sepharose-Gel CL 2B mit 0,5 % SDS-haltigem Puffer chromatographiert. Die Extinktion der Eluatfraktionen wurde bei 260 nm ausgemessen. Zusätzlich erfolgte die bei 500 nm auszumessende Proteinbestimmung.

Bestrahlungsbedingungen			Anteil am Gesamtprotein im Bereich der Fr. 100 bis 130
Dosis (Gy)	Atmosph.	Temp.(°C)	(%)
2×10^4	N ₂	2	1,02
2×10^4 *)	N ₂	2	0,40
4×10^4	N ₂	2	4,35
6×10^4	N ₂	2	6,96
6×10^4	N ₂	37	1,85
6×10^4	Luft	2	11,83
6×10^4	Luft	37	6,02

Tabelle II: Prozentualer Anteil des Proteins (um den nativen Anteil korrigiert) im Bereich der Fraktionen 100 bis 130 am Gesamtprotein nach Bestrahlung von intakten E.coli-Bakterien K-12 AB 1157 unter verschiedenen Bedingungen. Die Festlegung dieses Fraktionsbereiches ist im Text erklärt.

*) Bei diesem Versuch wurden Bakterien in der streng logarithmischen Wachstumsphase bestrahlt (siehe 3.5.2), während alle anderen dargestellten Werte aus Bestrahlungsversuchen mit Bakterien in der stationären Wachstumsphase stammen.

3.5.2 Gelfiltration nach Bestrahlung intakter Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase

Während der Phase des raschen Wachstums von Bakterienpopulationen besitzen die Zellen aufgrund ihrer gesteigerten Syntheseaktivität einen höheren Gehalt an Ribonucleinsäuren und Proteinen als in der Ruhephase (UMBREIT, 1962). Davon ausgehend erhoffte man sich ein noch deutlicheres Hervortreten von Veränderungen dieser Substanzgruppen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Bakterien aus der streng logarithmischen Wachstumsphase.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden jeweils zwei Bakterienkulturen, die sich spektralphotometrisch gesichert (siehe auch 2.1.3), in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, entsprechend der Versuchsdurchführung mit Bakterien in der stationären Phase behandelt.

Zunächst jedoch wurde Cytosol aus unbestrahlten Bakterien dieser Wachstumsphase auf die Gelsäule gebracht. Wie aus Abb. 12 ersichtlich, führte das gegenüber früheren Gelfiltrationen von nativem Cytosol zu einem im großen und ganzen gleichen Verlauf der Elutionskurve. Lediglich der erste Anteil weist zu Beginn eine mäßige Schulter auf, wie sie bei der Chromatographie von mittels Lysozym isoliertem Zellmaterial beobachtet wurde, bei Versuchen mit Ultraschall-Lyse jedoch bisher fehlte (Abb. 5). Außerdem ist die Menge an UV-absorbierendem Material insgesamt verringert. Beides ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Bakteriendichte der Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase nur etwa halb so groß war wie die der Kulturen in der Ruhephase. ⁺)

⁺) Dadurch wurde die Ausbeute an Zellinhaltsbestandteilen absolut gesehen natürlich vermindert, jedoch nicht um die Hälfte, was besagt, daß sie relativ erhöht war.

Nach Bestrahlung der Bakterien mit 2×10^4 Gy unter N_2 bei $2^\circ C$ zeigt sich im Chromatogramm gegenüber dem nativen Cytosol der Abbau der initialen Schulter des ersten Anteils und die Verlagerung des Extinktionsmaximums um 10 Fraktionen in Richtung größerer Elutionsvolumina (Abb. 12). Berechnet man aufgrund der Proteinbestimmungskurve den prozentualen Proteinanteil, der im Vergleich zum unbestrahlten Zellmaterial verfrüht eluiert wird, so erhält man den Wert 0,4 (Tab. II), einen niedrigeren Wert also als nach der Bestrahlung von Bakterien in der Ruhephase unter gleichen Bedingungen.

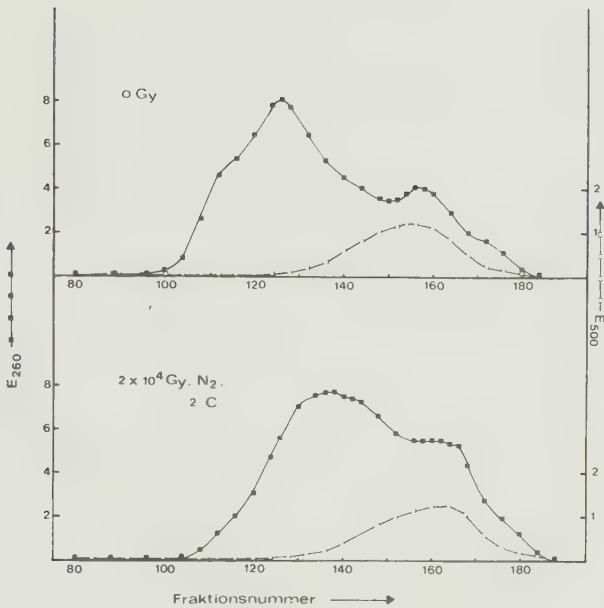


Abb. 12: Chromatogramme von Cytosol aus E.coli-Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase.

Das aus E.coli-Bakterien, die sich in der streng logarithmischen Wachstumsphase befanden, gewonnene Zellmaterial wurde in unbestrahltem Zustand bzw. nach Bestrahlung der intakten Bakterien mit 2×10^4 Gy bei $2^\circ C$ und unter N_2 und anschließender Lyse auf das Sepharose-Gel CL 2B aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels 2×10^{-2} M Phosphatpuffer, der 0,5 % SDS enthielt, das Ausmessen der Extinktion bei 260 nm. Bei 500 nm wurde der färberische Proteinnachweis in den Fraktionen bestimmt.

3.5.3 Gelfiltration nach Bestrahlung von Cytosol aus Bakterien in der stationären Wachstumsphase

Für die Bestrahlungsversuche an Zellmaterial, das aus Bakterien in der stationären Wachstumsphase isoliert wurde, wurden jeweils zwei Übernachtskulturen gewaschen, mit 10 ml Phosphatpuffer wiederaufgenommen und lysiert. Sollte die Bestrahlung in Anwesenheit der Zellhüllen erfolgen, so wurde das gesamte Lysat verwendet; ansonsten wurden die Zellhüllen durch Abzentrifugieren entfernt. Es wurde mit 1 bzw. 6×10^4 Gy und ausschließlich bei 2 °C unter N₂ oder Luft bestrahlt. Das weitere Vorgehen bei der Chromatographie entsprach demjenigen nach Bestrahlung intakter Bakterien.

In Abb. 13 findet sich eine Gegenüberstellung von Ergebnissen, die nach Strahleneinwirkung auf Bakterien bzw. auf Cytosol ohne Zellhüllen ermittelt wurden. Die bei 2 °C applizierte Dosis betrug jeweils 6×10^4 Gy.

Werden die Bakterien unter N₂ bestrahlt, so zeigen sich die bereits beschriebenen Auswirkungen auf die UV-Absorptionskurve und die Proteinbestimmungskurve (Abb. 13a). Diese Effekte treten bei Bestrahlung von Cytosol verstärkt auf (Abb. 13b). Die beiden Anteile des Chromatogramms verschmelzen fast völlig miteinander; die Elution der Proteine beginnt noch früher, wobei schon bald deutlich höhere Extinktionswerte erreicht werden (siehe auch Tab. III); das Extinktionsmaximum der Proteinbestimmungskurve ist in Bereiche niedrigerer Fraktionsnummern verschoben. Darüberhinaus bildet sich im Chromatogramm in auffallender Weise eine langgezogene Schulter aus, die offensichtlich aus dem ersten Anteil erwächst. Folglich haben hierbei in sehr ausgeprägtem Maße Molekülvergrößerungen stattgefunden, bei denen Proteine beteiligt sind. Auch die Bestrahlung des Cytosols unter Luft führt zu einer Zunahme der Veränderungen in der Elutionskurve,

die für den Versuch mit intakten Bakterien schon dargelegt wurden (Abb. 13c). Das gesamte UV-absorbierende Material wird in einem Peak eluiert. Dessen Basis ist jedoch wesentlich schmaler und das höhere Extinktionsmaximum ist noch weiter zu einem größeren Elutionsvolumen verschoben (Abb. 13d). Die Proteine dagegen erscheinen im Vergleich zu unbestrahltem Zellmaterial (siehe Abb. 5) nicht mehr früher. Als Schlußfolgerung kann festgehalten werden, daß bei der Bestrahlung von Cytosol unter Luft mit der Höchstdosis keine Vergrößerung von Molekülen mehr eintritt, sondern nur noch die Zerstörung der makromolekularen Nucleinsäuren sowie von Proteinen. Ganz anders die Effekte bei Bestrahlung unter N_2 . Hier fällt vor allem die Molekulargewichtszunahme von Proteinen auf; die Zerstörung von Molekülen ist nur von zweitrangiger Bedeutung.

Daß auch die bei der Bestrahlung von Cytosol eintretenden Veränderungen mit Steigerungen der applizierten Dosis zunehmen, läßt die Abb. 14 erkennen. Hier sind jeweils zwei Bestrahlungsversuche mit Cytosol ohne Zellhüllen in Gegenwart von Luft bzw. unter N_2 mit den Dosen 1 und 6×10^4 Gy dargestellt. Die Alterationen, die sich nach Bestrahlung mit 1×10^4 Gy einstellen (Abb. 14a und c), entsprechen in etwa denen, die nach Bestrahlung von Bakterien mit 6×10^4 Gy unter sonst gleichen Bedingungen auftreten (Abb. 13a und c). Dies bedeutet wiederum, daß die Röntgenstrahlen an isoliertem Cytosol eine größere Wirksamkeit entfalten können als an intakten Bakterien. Es scheint also im lebenden Bakterium, dessen strukturelle Integrität gewahrt ist, ein Schutzmechanismus zu existieren, der die schädigende Wirkung der Strahlen reduziert. Darauf wird später im Teil Diskussion noch eingegangen. Schließlich sei zu Abb. 14 noch bemerkt, daß nach Bestrahlung unter Luft mit relativ niedrigerer Dosis eine verfrühte Elution von Proteinen eintritt (Abb. 14c),

während dies bei Bestrahlung mit der Höchstdosis unter sonst gleichen Bedingungen nicht der Fall ist.

Um eine mögliche Schutzwirkung der Zellhüllen gegen Röntgenstrahlen z.B. durch Scavengerwirkung auch nach Zerstörung der strukturellen Integrität der Bakterien zu überprüfen, sollte ein Vergleich des Elutionsverhaltens der Zellbestandteile nach Bestrahlung des Cytosols mit bzw. ohne die Bruchstücke der Zellwände und -membranen angestellt werden. Dazu wurde das vollständige Lysat wie vorher reines Cytosol mit 6×10^4 Gy unter N_2 bei 2 °C bestrahlt. Danach erfolgte die Entfernung der Hüllen durch Abzentrifugieren und das Aufbringen des restlichen Lysates auf das Gel. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abb. 15 zu finden. Man sieht, daß kein wesentlicher Unterschied im chromatographischen Verhalten des Cytosols deutlich wird, ob es nun in Anwesenheit der Zellhüllen bestrahlt wird oder nach deren vorhergehenden Abtrennung. Jedoch ist der Anteil des Proteins in den vorderen Fraktionen kleiner, wie sich aus Tabelle III ersehen läßt.

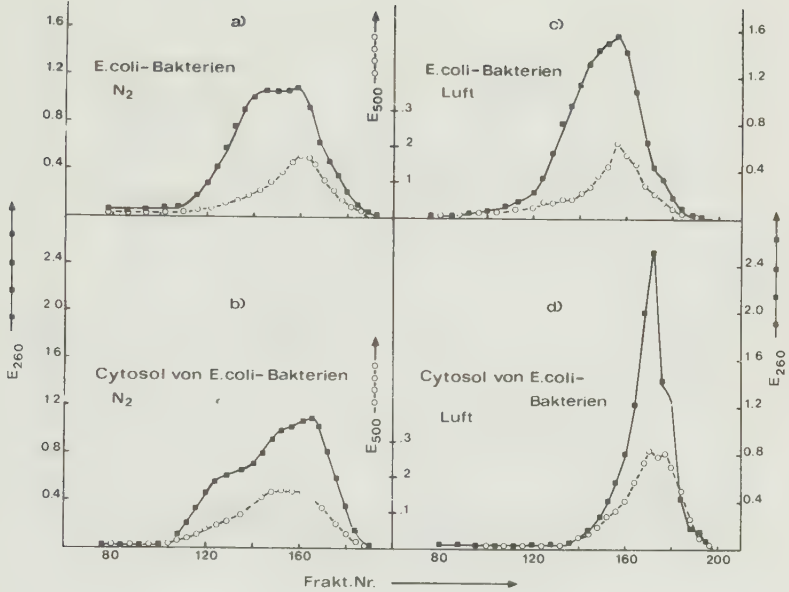


Abb. 13: Vergleich der Auftrennung des Cytosols nach Bestrahlung intakter Bakterien bzw. von isoliertem Cytosol. Die Bestrahlung der intakten E.coli-Bakterien bzw. des primär isolierten Cytosols erfolgte mit 6×10^4 Gy bei 2 °C unter N₂-Atmosphäre oder unter Luft (O₂). Die Chromatographie und die Erstellung der Elutionskurven geschahen in der üblichen Weise.

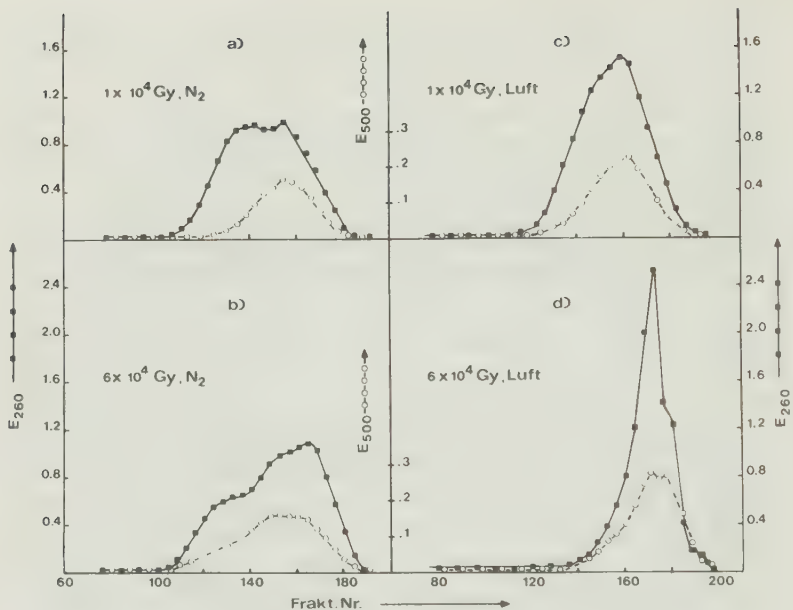


Abb. 14: Chromatogramme nach Bestrahlung von isoliertem Cytosol aus Bakterien in der stationären Wachstumsphase. Das Cytosol, das bei 2 °C mit 1×10^4 bzw. 6×10^4 Gy unter N_2 bzw. unter Luft bestrahlt wurde, wurde aus *E.coli*-Bakterien in der stationären Wachstumsphase isoliert. Die Zellhüllen wurden vor der Strahleneinwirkung entfernt. Die chromatographische Auftrennung und die Erstellung der Elutionskurven geschahen in der üblichen Weise.

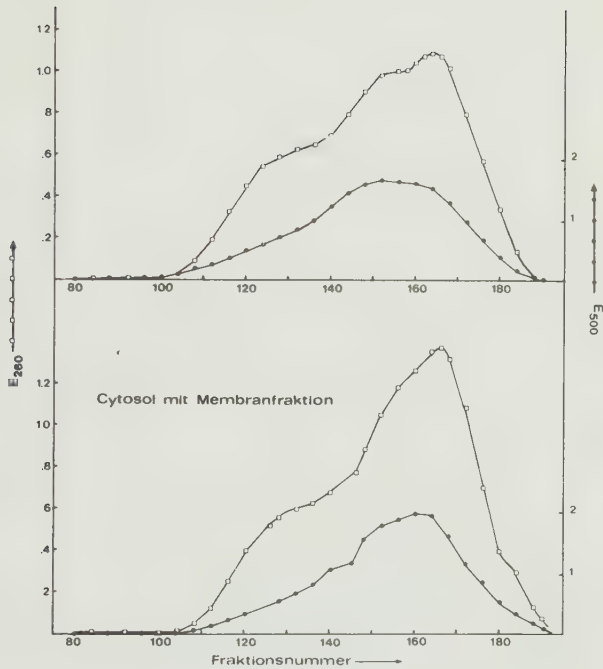


Abb. 15: Gelfiltration nach Bestrahlung von Cytosol aus Bakterien in der stationären Wachstumsphase in Gegenwart bzw. Abwesenheit der Zellhüllen.

Das von den Zellhüllen befreite Cytosol bzw. das vollständige Zell-Lysat wurde bei 2 °C mit 6×10^4 Gy in N_2 -Atmosphäre bestrahlt. Vor der Chromatographie im Sepharose-Gel CL 2B wurden auch aus dem bestrahlten kompletten Lysat die Zellhüllen entfernt. Die Chromatographie und die Erstellung der Elutionskurven erfolgte gemäß den vorangegangenen Versuchen.

Bestrahlungsbedingungen			Anteil am Gesamtprotein im
			Bereich der Fr. 100 bis 130
Zellhüllen Dosis (Gy)	Atmosph.		(%)
Ø	1×10^4	Luft	2,53
Ø	1×10^4	N ₂	3,53
Ø	6×10^4	Luft	0,61
Ø	6×10^4	N ₂	12,84
+	6×10^4	N ₂	7,44

Tabelle III: Prozentualer Anteil des Proteins (um den nativen Anteil korrigiert) im Bereich der Fraktionen 100 bis 130 am Gesamtprotein nach Bestrahlung von isoliertem Cytosol mit unterschiedlicher Dosis und Atmosphäre.

Ø : Bestrahlung erfolgte ohne Zellhüllen

+: Bestrahlung in Anwesenheit der Zellhüllen

Die Bestrahlungstemperatur betrug jeweils 2 °C.

Wie bereits bei den Bestrahlungsversuchen an intakten Bakterien wurde auch nach Bestrahlung von Cytosol aus Bakterien der stationären Wachstumsphase der prozentuale Anteil des Proteins im Bereich der Fraktionen 100 bis 130 am Gesamtprotein halbquantitativ ermittelt. Die Wahl dieses Fraktionsbereiches und die Korrektur der Werte um den schon bei der unbestrahlten Probe erscheinenden Proteinanteil wurde bereits auf S. 45 erläutert.

4. DISKUSSION

4.1 Vergleichende Beurteilung der beiden angewandten Lyse-Verfahren

4.1.1 Praktische Durchführbarkeit der Verfahren

Bei der routinemäßigen Anwendung der beiden Zellaufschlußverfahren im Rahmen der Bestrahlungsversuche erwies sich die Ultraschall-Lyse als die weitaus vorteilhaftere Methode. Dies bezieht sich zum einen auf die Zeitdauer der Durchführung und zum anderen auf die durch die Vielzahl der nötigen Einzelschritte bedingte größere Störanfälligkeit der Lysozym-Lyse.

Beanspruchte die Herstellung des Lysates von bestrahlten Bakterienzellen mittels Lysozym durchschnittlich $3 \frac{1}{4}$ bis $3 \frac{1}{2}$ Stunden, so konnte das gleiche mit Hilfe von Ultraschall innerhalb von ca. 25 Min. erreicht werden. Diese relativ lange Zeitdauer der Lysozym-Lyse brachte es mit sich, daß auch die für die Durchführung des Gesamtversuches benötigte Zeit unpraktikabel in die Länge gezogen wurde. Vom Abzentrifugieren der Bakterienkulturen bis zum Start der Gel-filtration vergingen je nach Bestrahlungsdauer und Versuchsablauf $7 \frac{1}{2}$ bis $12 \frac{1}{2}$ Stunden. Zudem war es nicht möglich, den Arbeitsgang zwischen diesen Stationen zu unterbrechen und zu einem späteren Zeitpunkt fortzuführen, was bei der Anwendung der Ultraschall-Lyse machbar war. Hierbei konnte z.B. die Bakteriensuspension nach der Bestrahlung bedenkenlos eingefroren und später wieder aufgetaut und weiter verarbeitet werden. Versuchte man das gleiche bei Anwendung der Lysozym-Lyse, so fand sich anschließend im Chromatogramm fast regelmäßig eine nicht mehr verwertbar geringe Ausbeute an UV-absorbierendem Material. Verursacht wurde dies offensichtlich dadurch, daß für die Lysozym-Lyse die Bakterien nach der Bestrahlung abzentrifugiert werden mußten, um in

Tris-Puffer aufgenommen zu werden. Dabei ging anscheinend ein großer Teil des Zellmaterials verloren, insbesondere, wenn die bestrahlten Zellen noch zusätzlich eingefroren und wieder aufgetaut wurden. Zu Verlusten an Zellmaterial kam es in unterschiedlichem Ausmaß auch bei der Durchführung des Versuchsganges ohne Unterbrechung. Dies machte sich vor allem beim Abzentrifugieren der osmotisch empfindlichen Zellen aus der Saccharose-Lysozym-EDTA-Lösung bemerkbar. Manchmal fand sich hierbei ein sichtlich hochvisköser Überstand und ein nur sehr kleines Pellet. Wurde die optische Dichte des Überstandes bei 260 nm ausgemessen, so ergaben sich Extinktionswerte bis zu 0,2. Erklärbar ist diese Tatsache aus einer Untersuchung von BIRDSELL und COTA-ROBLES (1967) über das Verfahren der Lysozym-Lyse. Die Autoren stellten fest, daß Saccharose zunächst zur Plasmolyse führt und dadurch das Lysozym befähigt, auf die starre Zellwand einzuwirken, daß sie dann jedoch eine Stabilisierung der osmotisch sensiblen Zellen bewirkt. Die Entfernung der Saccharose von lysozymbehandelten Zellen führt zu einer sofortigen Lyse.

Einen weiteren Störfaktor bei der enzymatischen Lyse stellte der Umstand dar, daß es zuweilen beim Öffnen des Zentrifugenglases im Anschluß an die Zentrifugation bei 4 °C zu einem blitzartigen Gefrieren des Überstandes kam. Dadurch wurde nach dem Auftauen eine erneute Zentrifugation nötig; dies bedeutete Zeitverlust und zusätzlicher Verlust an Zellmaterial.

4.1.2 Ausbeute an UV-absorbierendem Material und ihre Reproduzierbarkeit

Die Ausmessung der Extinktion bei 260 nm des Cytosols nach dem Aufschluß unbestrahlter Bakterien ergab nach Einwirkung von Lysozym Werte zwischen 0,27 und 0,33, im Mittel 0,30, nach Ultraschalleinwirkung stets den Wert 1,18 (siehe 3.2).

Diese Werte lassen erkennen, daß die Ausbeute an UV-absorbierendem Material durch die Lysozym-Lyse nicht exakt reproduzierbar ist. Offensichtlich ist dies auf die zufälligen, mehr oder weniger vermeidbaren bzw. unvermeidbaren Störfaktoren, die bereits in 4.1.1 genannt wurden, zurückzuführen. ROBERTSON, CRAMP und WATKINS (1978), die unter ähnlichen Bedingungen den enzymatischen Aufschluß von Bakterien durchführten, machten ebenfalls die Erfahrung, daß die Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse einer gewissen Variationsbreite unterlagen. Von einer hervorragenden Reproduzierbarkeit der Ausbeute durch die Ultraschall-Lyse hingegen berichtet DEUBER (1982) nach Anwendung des Verfahrens zum Aufschluß von E.coli-Zellen. Diese Feststellung kann aufgrund eigener Ergebnisse bestätigt werden. Ferner zeigen diese Werte, daß die Menge an UV-absorbierendem Material nach dem Zellaufschluß mittels Ultraschall ca. vier mal größer ist als nach Lysozymeinwirkung. Dies läßt sich im wesentlichen auf drei Ursachen zurückführen:

- Bei der Ultraschall-Lyse konnte in einem Versuchsgang die doppelte Bakterienmenge aufgeschlossen werden.
- Durch das für die Durchführung des enzymatischen Lyse-Verfahrens notwendige Zentrifugieren der Proben ging, wie bereits diskutiert, in wechselndem Ausmaß UV-absorbierendes Material des Zellinnern mit dem jeweiligen Überstand verloren. Es muß angenommen werden, daß dadurch bis zu einem Drittel der maximal erreichbaren Ausbeute nicht mehr verfügbar war. Denn, geht man davon aus, daß bei der Ultraschall-Lyse unter den angewandten Bedingungen ca. 95 % der beschallten Bakterien lysiert werden (DEUBER, 1982), so würde eine hundertprozentige Ausbeute einer O.D.₂₆₀ von 1,24 entsprechen. Für die halbe Bakterienmenge, wie sie bei der enzymatischen Lyse vorlag, müßte man demnach bei maximaler Ausbeute eine O.D.₂₆₀ von 0,62 erwarten. Gemessen wurde aber durchschnittlich nur eine O.D.₂₆₀ von 0,30. Bis zu 0,2 der maximal zu erwartenden O.D.₂₆₀ ging bekanntlich durch die Zentrifugation verloren.

- Aus den voranstehenden Überlegungen kann gefolgert werden, daß bei der Lysozym-Lyse nur etwa 70 - 75 % der behandelten Bakterien in osmotisch sensible Sphäroblasten überführt wurden. BIRDSELL und COTA-ROBLES (1967) dagegen konnten durch die enzymatische Lyse von E.coli B bzw. K-12 W 2244 80 % bzw. 87 % osmotisch empfindliche Zellen gewinnen. Diese Autoren arbeiteten jedoch mit physiologisch jungen Bakterien aus der späten lag- oder der frühen log-Phase und zudem mit anderen Konzentrationsverhältnissen. ROBERTSON, CRAMP und WATKINS (1978) berichten, daß sie bei der Lysozym-Lyse von E.coli B/r bzw. B_{s-1} eine Ausbeute von mindestens 85 % erreichten. Allerdings weisen sie darauf hin, wie schon ROBERTSON (1976), daß für die Lyse der verschiedenen E.coli-Stämme unterschiedliche Bedingungen hinsichtlich der Inkubationszeiten und der Konzentrationsverhältnisse nötig sind, um jeweils eine derartige Ausbeute zu erhalten. Es ist also zu vermuten, daß die in dieser Arbeit angewandten Lyse-Bedingungen für den Aufschluß von E.coli-Bakterien der Linie K-12 AB 1157 noch nicht optimal waren.

4.1.3 Gewinnung eines isolierten DNA-Peaks im Chromatogramm

Wie aus Abb. 5 zu ersehen und in 3.2 bereits beschrieben ist, erscheint bei der Gelfiltration von Cytosol, das durch Einwirkung von Lysozym gewonnen wurde, im Chromatogramm ein isolierter DNA-Peak. Dies widerspricht der Auffassung von JESSBERGER (1979), der unter Berufung auf andere Autoren meint, daß durch die Zell-Lyse und die darauffolgende Abzentrifugation der Zellmembran die DNA aus der Lösung entfernt wird, da sie an die Membran gebunden vorliegt. Tatsächlich kann als gesichert angesehen werden, daß die DNA in der Bakterienzelle an die Cytoplasmamembran gebunden ist (SCHAECHTER, 1975) und, daß es möglich ist, durch schonende Zell-Lyse die DNA-Membran-Fraktion von den übrigen Zellin-

haltsbestandteilen zu isolieren (SMITH, SCHALLER und BONHOEFFER, 1970; KNIPPERS und STRÄTLING, 1970; OKAZAKI, SUGIMOTO, OKAZAKI, IMAE und SUGINO, 1970). Jedoch wiesen STRÄTLING und KNIPPERS (1971) darauf hin, daß bei den Isolierungsverfahren für die Präparierung von DNA-Membran-Komplexen wahrscheinlich ein Teil der DNA von der Membran abgetrennt wird und dadurch in frei löslicher Form vorliegt. Diese Annahme konkretisierten ROBERTSON, CRAMP und WATKINS (1978). Sie fanden, daß bei der Anwendung der Lysozym-Lyse zum Aufschluß von E.coli-Bakterien B/r bzw. B_{s-1} unter bestimmten, den in der vorliegenden Arbeit angewandten sehr ähnlichen Bedingungen bis zu 34 % (B/r) bzw. 43 % (B_{s-1}) der Zell-DNA im Überstand enthalten waren. Es kommt also beim Aufschluß von E.coli-Bakterien mittels Lysozym zur Abscherung von DNA vom DNA-Membran-Komplex, wobei das Ausmaß dieses Vorganges anscheinend von den Eigenschaften des jeweiligen Bakterienstammes und/oder den Lysebedingungen abhängig ist.

Bei Anwendung der Ultraschall-Lyse dagegen konnte kein isolierter DNA-Peak gewonnen werden (Abb. 5). Die Zell-DNA findet sich hierbei in Form von kleineren Bruchstücken über das Chromatogramm verteilt. Dies bedeutet im Hinblick auf die Problemstellung dieser Arbeit, daß nur Aussagen über die makromolekularen Nucleinsäuren der Bakterienzelle im allgemeinen gemacht werden können, nicht aber speziell über das Verhalten der DNA.

4.1.4 Möglichkeiten der Optimierung des Aufschlußverfahrens mittels Lysozym

Der zuletzt angesprochene Aspekt, getrennte Aussagen über das chromatographische Verhalten der DNA und der RNA nach Bestrahlung von Bakterienzellen machen zu können, läßt den

Versuch lohnend erscheinen, die enzymatische Lyse-Methode zu verbessern. Anzustreben wäre hierbei, die Nachteile, die dieses Verfahren hinsichtlich der praktischen Durchführbarkeit, der Größe der Ausbeute und der Reproduzierbarkeit gegenüber der Ultraschall-Lyse aufweist, so weitgehend wie möglich zu beseitigen.

Eine Erhöhung der Ausbeute kann durch optimale Lysebedingungen erreicht werden. Das bedeutet, daß für den bei den Bestrahlungsversuchen verwendeten Bakterienstamm spezifische Konzentrationsverhältnisse und Inkubationszeiten ermittelt werden müssen, die ein Maximum an Ausbeute erbringen.

Eine eventuell mögliche Verkürzung der Inkubationszeiten und der Dauer der Zentrifugationsschritte würde die zeitliche Belastung durch das Lyse-Verfahren verringern.

Die Herabsetzung der Störanfälligkeit des Verfahrens durch zufällige Ereignisse und somit eine bessere Reproduzierbarkeit könnte durch die Reduktion der Anzahl der einzelnen Verfahrensschritte, insbesondere der Zentrifugationsschritte, erzielt werden.

Ein völliger Ausgleich der genannten Nachteile der enzymatischen Aufschlußmethode gegenüber der Ultraschall-Lyse kann aber auch durch die Ausführung der vorgeschlagenen Maßnahmen wohl nicht erreicht werden.

	Lysozym-Lyse	Ultraschall-Lyse
Zeitdauer	3 1/4 - 3 1/2 h	ca. 25 Min.
Durchführbarkeit	problematisch	problemlos
Störanfälligkeit	groß	keine
Ausbeute	ca. 50 % *)	ca. 95 %
DNA-Peak im Chromatogramm	vorhanden	nicht vorhanden
Reproduzierbarkeit	variabel	hervorragend

Tabelle IV: Gegenüberstellung des enzymatischen Zellaufschlußverfahrens mittels Lysozym und der mechanischen Lyse mit Hilfe von Ultraschall bei E.coli K-12 AB 1157.

Die Tabelle gibt eine Übersicht über einige wichtige Kriterien für die Beurteilung der beiden Aufschlußverfahren unter den in der vorliegenden Arbeit angewandten Bedingungen.

*) Diese Zahl gibt nicht den prozentualen Anteil der lysierten Zellen wieder, sondern den Anteil der tatsächlich erhaltenen Menge an UV-absorbierendem Material an der maximal erreichbaren Menge.

4.2 UV-Absorptionsspektren des Cytosols

Obwohl es sich bei der Aufzeichnung von UV-Absorptionsspektren des bestrahlten Cytosols um eine einfache Methode handelt, mit deren Hilfe zumindest eine qualitative Abschätzung der strahleninduzierten Veränderungen von Makromolekülen des Zellinhaltes möglich ist, wurde in der Literatur bisher keine entsprechende Vorgehensweise beschrieben. KIEFER (1981) zeigt ein Absorptionsspektrum nativer DNA im UV-Bereich, das den gleichen Verlauf nimmt, wie das eigene Absorptionsspektrum nativem Cytosols. Das bedeutet, daß praktisch ausschließlich die Nucleinsäuren der Zelle die Absorption des gesamten Cytosols im UV-Bereich prägen, obwohl bekannt ist, daß auch Proteine v.a. durch ihre aromatischen Aminosäuren in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Die Absorption der Nucleinsäuren an ihrem Absorptionsmaximum bei 260 nm ist bei neutralem pH neben den anderen Basen v.a. durch die Purinbase Adenin bedingt (DAVIDSON, 1965). SCHACHINGER (1962) fand bei der Aufzeichnung von UV-Spektren dieser Base nach Röntgenstrahlung eine mit zunehmender Dosis deutlicher werdende Abnahme der Extinktion bei 260 nm und erklärte dies durch einen strahlenbedingten Abbau des Adenins. Von einer Zunahme der Extinktion im gesamten Wellenlängenbereich von UV-Absorptionsspektren, die nach Bestrahlung des Proteins LDH ausgemessen wurden, berichtet DENKL (1971). Er sieht darin eine mit steigender Dosis zunehmende Lichtstreuung, hervorgerufen durch die Bildung größerer Moleküle unter Röntgenbestrahlung. Da er aber nach rechnerischem Abzug der durch Lichtstreuung bedingten Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum des Proteins, eine dosisabhängige Abnahme des Extinktionswertes fand, spricht er von zwei strahleninduzierten Konkurrenzreaktionen, nämlich die Zerstörung aromatischer Aminosäuren und die Molekülvergrößerung.

Bei den eigenen Versuchen ergaben sich, wie aus Abb. 8 und 9 zu ersehen, im wesentlichen folgende Veränderungen der UV-Absorptionsspektren des Cytosols im Wellenlängenbereich von 320 - 240 nm.

- Nach Bestrahlung intakter Bakterien unter anoxischen Bedingungen bei 2 °C zeigt sich mit Erhöhung der zugeführten Strahlendosis eine Zunahme der UV-Absorption im gesamten Verlauf der Spektren. Gleiches gilt für die Bestrahlung bei 37 °C unter ansonsten identischen Bedingungen.
- Die Bestrahlung von Cytosol unter Sauerstoffausschluß bei 2 °C führt ebenfalls zu einer Zunahme der UV-Absorption im gesamten Wellenlängenbereich. Allerdings ist hier die Erhöhung bei 320 nm im Vergleich mit den Spektren, die nach Bestrahlung intakter Bakterien gewonnen werden, stärker ausgeprägt, bei 260 nm hingegen schwächer.
- Zeichnet man die Absorptionsspektren nach Bestrahlung des Cytosols unter Luft bei 2 °C auf, so findet man bei 320 nm ähnliche Extinktionswerte wie nach Bestrahlung unter N₂. Jedoch liegen hier die Werte bei 260 nm bei gleicher Strahlendosis deutlich niedriger. Dies zeigt sich besonders nach Applikation der Maximaldosis von 6×10^4 Gy, die zu einem Extinktionswert bei 260 nm führt, der sogar weit unter dem der Kontrollkurve mit nativem Cytosol liegt.

Zur besseren Übersicht über die strahleninduzierten Veränderungen der UV-Absorption des Cytosols wurde in Tabelle V die jeweilige Zu- bzw. Abnahme der Extinktionswerte bei 260 und 320 nm gegenüber der Kontrollkurve für verschiedene Bestrahlungsbedingungen angegeben.

Nach Auffassung verschiedener Autoren kann die ermittelte Extinktionserhöhung bei 320 nm nur durch verstärkte Lichtstreuung verursacht sein, da keine chromophoren Gruppen bekannt sind, die in diesem Bereich merklich absorbieren. Dafür spricht auch, daß im UV-Absorptionsspektrum des unbestrahlten Cytosols oberhalb der Wellenlänge von 310 nm keine Extinktion feststellbar ist. Eine stärkere Lichtstreuung aber läßt sich nur durch die Entstehung größerer Moleküle während der Röntgenbestrahlung erklären. Vergrößerung bedeutet entweder Entfaltung von Molekülen oder Bildung von Molekülaggagaten. Da die Zellproteine bereits bei der Aufnahme des Absorptionsspektrums von unbestrahltem Zellmaterial durch die Einwirkung des SDS in denaturiertem Zustand vorliegen (siehe 3.1.1), können diese gegenüber der Kontrollkurve nicht mehr zu einer Zunahme der Streuung durch Entfaltung beitragen. Bleibt die Frage, ob vielleicht die strahleninduzierte Denaturierung der Nucleinsäuren hierbei eine Rolle spielt. Diese Möglichkeit kann nur von untergeordneter Bedeutung sein, denn es ist anzunehmen, daß auch die Nucleinsäuren zumindest teilweise durch die Wirkung des SDS entfaltet werden. Man kann also davon ausgehen, daß die Zunahme der Lichtstreuung im wesentlichen durch die Zusammenlagerung von Molekülen des Zellinhaltes bedingt ist.

Aus Tabelle V ist zu entnehmen, daß die vermehrte Lichtstreuung, also die Entstehung von Molekülaggagaten, auch bei Bestrahlung unter Luft in einem erstaunlichen Ausmaß auftritt. Bei der Beurteilung dieses Befundes sollte zunächst auch einmal die Frage gestellt werden, ob während der Bestrahlung die Sauerstoffspannung in der bestrahlten Probe für einen maximalen Sauerstoffeffekt ausreichend groß war. Im allgemeinen geht man davon aus, daß dies bereits in luftgestättigten Suspensionen der Fall ist (KIEFER, 1981). WHILLANS und RAUTH (1980) aber fanden bei der Röntgenbestrahlung von zellfreien Lösungen eine mit wachsender Dosisrate zunehmende

Sauerstoffverarmung der Probe. Sie erklären dies damit, daß die Radiolyseprodukte des Wassers sekundär Spezies erzeugen, die rasch Sauerstoff binden. Gemäß diesen Autoren stellt sich während der Bestrahlung in der Probe ein niedrigerer Sauerstoffsättigungsgrad ein als in der sich darüber befindlichen Gasphase. Das Niveau dieser Sättigung ist abhängig von der Höhe der Dosisrate, die bei den eigenen Versuchen mit 333 Gy/Min. sehr hoch war, und von der Sauerstoffaufnahmefähigkeit der Lösung. Diese wird um so geringer, je niedriger das Angebot aus der darüberliegenden Atmosphäre, je niedriger innerhalb bestimmter Grenzen die Umdrehungsgeschwindigkeit des Magnetrührers und die Temperatur der Lösung und je größer das Probenvolumen und die Schichtdicke ist. In Anbetracht dieser Angaben muß mit einer unteroptimalen O_2 -Sättigung der Suspensionen während der Bestrahlung unter Luft zumindest gerechnet werden. Eine eventuelle Sauerstoffverarmung der Probe kann aber sicherlich die bei Bestrahlung unter Luft beobachtete Molekülvergrößerung allein nicht erklären, so daß angenommen werden muß, daß es auch in Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung von Molekülaggregaten kommt.

Natürlich macht sich die verstärkte Lichtstreuung nach Bestrahlung nicht nur bei 320 nm bemerkbar, sondern sie bewirkt eine Extinktionserhöhung im gesamten Wellenlängenbereich der UV-Absorptionsspektren, also auch bei 260 nm. Leider konnte der Streuanteil an der Gesamtextinktion bei dieser Wellenlänge nicht ermittelt werden, da die Teilchen im gelösten Cytosol nicht die einfachen Voraussetzungen erfüllen, die für die Anwendung des Rayleigh'schen Gesetzes gegeben sein müssen. Diese Voraussetzungen umfassen die Forderungen, daß kugelförmige Teilchen vorliegen, deren Radius r wesentlich kleiner ist als die Wellenlänge λ des gestreuten Lichtes ($r \ll \lambda$). Ferner müssen die Teilchen unregelmäßig in weiten Abständen a verteilt sein, wobei a wesentlich größer

als λ sein muß ($a \gg \lambda$), d.h. eine entsprechend niedrige Konzentration ist erforderlich. In der wässrigen, mit SDS versetzten Cytosol-Lösung aber weichen die Moleküle stark von der Kugelform ab, die Nucleinsäuren, weil sie natürlicherweise in Kettenform vorliegen, die Proteine, weil sie durch das SDS entfaltet sind. Außerdem weist die DNA in der E.coli-Zelle in intaktem Zustand eine Länge von 1,1 mm auf (BACHMANN, 1976) und obwohl sie durch das angewandte Lyse-Verfahren fragmentiert wird, können die Bruchstücke mit ihrer Größe die Wellenlängen von 240 - 320 nm nicht wesentlich unterschreiten. Das gleiche gilt für die mRNA mit einer Länge von 10^2 - 10^3 nm und die rRNA, die in entfaltetem Zustand in etwa so lang wie die mRNA ist (16-s-rRNA) bzw. etwas länger (35-s-rRNA) (BUDDECKE, 1977). In den bei 260 nm ausgemessenen Extinktionswert gehen aber neben der Lichtstreuung noch zwei weitere Faktoren ein, nämlich der strahleninduzierte Abbau von Purin- und Pyrimidinbasen und die strahlenbedingte lokale Denaturierung der DNA. KIEFER (1981) schreibt, daß die Bestrahlung von doppelsträngiger DNA mit ionisierenden Strahlen zunächst zu einem Anstieg der Absorption in diesem Wellenlängenbereich führt, dann jedoch, bei höheren Dosen, zu einer progressiven Abnahme. Diese Zunahme der Absorption bei 260 nm nach Bestrahlung erklärt sich durch den hyperchromen Effekt (DERTINGER, JUNG, 1969; WHEELER, 1978). Durch Lösung von H-Brückenbindungen zwischen den Nucleinsäurebasen aufgrund der Strahleneinwirkung, erfolgt eine lokale Auflockerung und Entspiralisierung der Doppelhelix (HUG, 1974). Die einzelnen Nucleinsäurebasen aber absorbieren in freier Form mehr UV-Licht als im Verband der nativen doppelsträngigen DNA. Durch die partielle Eröffnung der Doppelhelix werden die Basen aber auch anfälliger für Strahlenschäden, so daß es mit steigender Dosis rasch zur Basenzerstörung und damit zum Verlust der Hyperchromie kommt (WHEELER, 1978). Die Abb. 8 läßt vermuten, daß bei der Be-

strahlung intakter Bakterien unter N_2 bis zur Dosis von 6×10^4 Gy noch kein bedeutender derartiger Verlust eintritt. Nach Bestrahlung bei 37 °C ist dies noch weniger der Fall als nach Bestrahlung bei 2 °C (Tabelle V). Niedrigere Extinktionswerte, obwohl noch mit zunehmender Dosis ansteigend, findet man nach Bestrahlung von Cytosol unter N_2 bei 2 °C (Tabelle V). Ein deutlicher Verlust der Hyperchromie, der mit Erhöhung der Dosis zunimmt, wird durch die Bestrahlung des Cytosols unter Luft herbeigeführt (Tabelle V). Insgesamt kann gesagt werden, daß die bei der Aufzeichnung der UV-Absorptionsspektren erzielten Ergebnisse gut mit den Angaben aus der Literatur übereinstimmen.

Zusammenfassend läßt sich aus der Anwendung dieses Verfahrens bereits sagen, daß bei der Röntgenbestrahlung unter Anwesenheit von Sauerstoff dem Nucleinsäureabbau die größere Bedeutung zukommt, obwohl auch gleichzeitig Molekülaggregate entstehen, während bei Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen die Molekülvergrößerung vorrangig ist.

Bestrahlungs- bedingungen	Dosis (Gy)	ΔE (%)	
		260 nm	320 nm
Bakt., N ₂ , 2 °C	6 x 10 ⁴	+ 6,02	+ 1,82
Bakt., N ₂ , 37 °C	6 x 10 ⁴	+ 6,54	+ 1,82
Cyt., N ₂ , 2 °C	1 x 10 ⁴	+ 1,64	+ 0,34
Cyt., N ₂ , 2 °C	6 x 10 ⁴	+ 2,50	+ 7,40
Cyt., Luft, 2 °C	1 x 10 ⁴	- 0,34	+ 0,52
Cyt., Luft, 2 °C	6 x 10 ⁴	- 12,39	+ 5,85

Tabelle V: Prozentuale Zu- bzw. Abnahme der Extinktion des Cytosols bei den Wellenlängen 260 und 320 nm nach Bestrahlung unter verschiedenen Bedingungen

Die Wellenlängen 260 und 320 nm wurden aus dem jeweiligen UV-Absorptionsspektrum des Cytosols herausgegriffen, weil bei ihrer Betrachtung die Effekte der verstärkten Lichtstreuung bzw. der Hyperchromie und deren Verlust am deutlichsten werden.

ΔE : Differenz zum Kontrollspektrum von unbestrahltem Cytosol

Bakt.: Bestrahlung intakter Bakterien

Cyt.: Bestrahlung von primär isoliertem Cytosol

+ : Zunahme

- : Abnahme

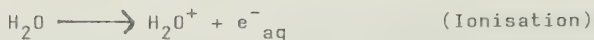
4.3 Gelchromatographie des Cytosols

4.3.1 Strahlenchemische Prozesse in wässrigen Lösungen und in der Zelle in Abwesenheit und in Anwesenheit von Sauerstoff

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Systeme bestrahlt, nämlich intakte Bakterienzellen und phosphatgepufferte wässrige Lösungen von Cytosol aus Bakterienzellen. Außerdem erfolgte die Strahleneinwirkung auf diese Systeme unter verschiedenen Atmosphären, Luft bzw. Stickstoff. Um eine fundierte Beurteilung der bereits geschilderten strahleninduzierten Veränderungen zu ermöglichen, soll zunächst ein kurzer Überblick über die strahlenchemischen Vorgänge unter den jeweiligen Bedingungen gegeben werden.

Hierbei muß bekanntlich zwischen einer direkten und indirekten Strahlenwirkung unterschieden werden. Der direkte Strahleneffekt wird durch die unmittelbare Wechselwirkung der beobachteten Moleküle mit energiereichen Röntgenquanten bzw. schnellen Sekundärelektronen hervorgerufen, die zu deren Ionisation oder energetischen Anregung führt. Dagegen erfolgt beim indirekten Strahleneffekt die Strahlenabsorption in der Umgebung des Testmoleküls. Dort werden Strahlenprodukte erzeugt, die sekundär auf chemischem Wege mit dem beobachteten Molekül reagieren können.

Bei der Röntgenbestrahlung wässriger Lösungen dominiert der indirekte Effekt (KIEFER, 1981), d.h., der größte Teil der eingestrahlten Energie wird vom Wasser absorbiert. Die dadurch verursachten primären Reaktionen im Wasser sind die Ionisierung und die Anregung mit nachfolgender homolytischer Spaltung des H_2O -Moleküls.

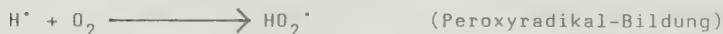


Als primäre Reaktionsprodukte finden sich also die radikalischen Substanzen H^* , OH^* und hydratisierte Elektronen (e^-_{aq}), die alle eine hohe chemische Reaktivität besitzen. Für die Röntgenbestrahlung von Wasser bei pH 7 wurden folgende Ausbeuten an den jeweiligen Zersetzungsprodukten pro 100 eV zugeführter Energie ermittelt (DRAGANIC, 1971):

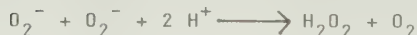
$$G(\text{OH}^*) = 2,70; \quad G(\text{e}^-_{\text{aq}}) = 2,65; \quad G(\text{H}^*) = 0,58.$$

Aus diesen G-Werten ist zu erkennen, daß sich bei diesen Bedingungen (Röntgenbestrahlung bei pH 7, Abwesenheit von Sauerstoff) die oxidierenden OH-Radikale und die reduzierenden hydratisierten Elektronen in etwa die Waage halten.

Andere strahlenchemische Verhältnisse liegen jedoch vor, wenn Sauerstoff hinzutritt. Sauerstoff nämlich besitzt eine große Affinität zu den Radiolyseprodukten H^* und e^-_{aq} . Er reagiert mit diesen Substanzen auf folgenden Wegen.



Als Folgereaktionen treten auf:



Es entsteht also in erhöhtem Ausmaß Wasserstoffperoxid unter gleichzeitiger Rückbildung eines Teiles des verbrauchten Sauerstoffs. Das H_2O_2 aber wird unter Bestrahlung lau-

fend wieder zersetzt, wobei OH-Radikale entstehen.

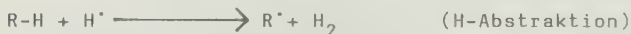
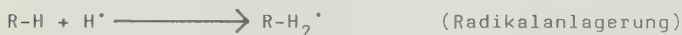


Folglich kommt es bei Bestrahlung unter Sauerstoff auf Kosten der Ausbeute an hydratisierten Elektronen und H-Radikalen zur Bildung von Peroxyradikalen und weiteren OH-Radikalen. Da diesen Reaktionsprodukten und insbesondere dem OH-Radikal eine herausragende biologische Wirkung zugeschrieben wird, scheinen die obigen Umsetzungen eine Erklärung des Sauerstoffeffektes zu beinhalten. So weist KIEFER (1981) darauf hin, daß Sauerstoff strahlensensibilisierend für Schädigungen wirkt, die durch das OH-Radikal herbeigeführt werden. Unter bestimmten Bedingungen kann Sauerstoff aber auch desensibilisierend wirken (BRUSTAD, 1966). Dies dürfte immer dann der Fall sein, wenn die Schäden auf die reduzierenden Radikale (e^-_{aq} , $\text{H}^\bullet$) zurückzuführen sind (DERTINGER, JUNG, 1969; KIEFER, 1981).

Betrachtet man nun die strahlenchemischen Prozesse in der intakten Zelle, so ist zunächst der Hinweis sehr wichtig, daß die E.coli-Zelle zu ca. 70 % aus Wasser besteht (WATSON, 1976). Den größten Teil der restlichen Zellbestandteile machen die Proteine (15 %), die RNA (6 %) und die DNA (1 %) aus. Es ist demnach berechtigt, den Inhalt intakter Bakterienzellen für die strahlenchemischen und -biologischen Überlegungen vereinfachend als wässrige Suspension anzusehen. Folglich treten auch hier qualitativ die gleichen Reaktionen unter Röntgenbestrahlung auf wie in wässrigen Lösungen. Allerdings besteht sicherlich ein quantitativer Unterschied, denn in der Zelle liegen die Makromoleküle hochkonzentriert vor. Die Untersuchungen verschiedener Autoren (HUTCHINSON et al., 1957; TANOOKA u. HUTCHINSON, 1965; BHATTACHARJEE, 1961) sprechen dafür, daß im Gegensatz zu verdünnten wässrigen Lösungen direkter und indirekter Strahleneffekt in

der Zelle etwa gleich groß sind. Dabei ist noch zu beachten, daß in der vorliegenden Arbeit die Bakterienzellen während der Bestrahlung in einem wässrigen Lösungsmittel suspendiert waren. Natürlich mußte es auch im Suspensionsmittel zur Wasserradiolyse kommen. Ob und inwieweit die hier entstandenen Zersetzungsprodukte das strahlenchemische Milieu in der Zelle beeinflussten, kann zur Zeit nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Die bei der Wasserradiolyse entstehenden Primärprodukte reagieren sekundär auf chemischem Wege mit den in der Zelle bzw. in der Lösung vorhandenen Biomolekülen. Als typische Wechselwirkungen zwischen den H- bzw. OH-Radikalen und diesen Molekülen sind die Radikalanlagerung oder die Abstraktion von Wasserstoff zu betrachten.



Die dabei entstehenden Makroradikale können durch intramolekulare Umlagerungen und unterschiedliche Arten der Weiterreaktion in einen Zustand irreversibler Schädigung übergehen. Einer der möglichen resultierenden Defektzustände ist offensichtlich die kovalente Quervernetzung zwischen Biomolekülen. Auf die strahlenbiologischen Vorgänge, die dieses Ereignis vermutlich herbeiführen, wird an entsprechender Stelle noch eingegangen.

4.3.2 Veränderungen des Elutionsverhalten der makromolekularen Nucleinsäuren

Aufgrund der Auswertung der UV-Absorptionsspektren wurde festgestellt, daß die Bestrahlung von intakten Bakterien bzw. von isoliertem Cytosol zu einer Vergrößerung von Zellmolekülen führt. Es ist aber auch bekannt, daß Biomoleküle, v.a. Nucleinsäuren, durch die Einwirkung von Röntgenstrahlen abgebaut werden. Dieser Vorgang bedingt die Verkleinerung der Moleküle. Die Gegenläufigkeit dieser beiden Reaktionen unter Einwirkung von ionisierenden Strahlen bringt es mit sich, daß die Ergebnisse hinsichtlich der Ausbeute an strahleninduzierten Quervernetzungen in Abhängigkeit vom jeweiligen Analyseverfahren verfälscht werden können.

MEE u. ADELSTEIN (1979) fanden nach Gamma-Bestrahlung von intakten Säugetierzellen und von isoliertem Chromatin eine Zunahme von Quervernetzungen zwischen DNA und Protein bis zu einer bestimmten Dosis, der dann, mit weiter steigender Dosis, eine leichte Abnahme folgte. Sie wandten dabei ein Membranfilterverfahren an, das auf einer selektiven Adsorption von Protein am Filter beruht. Mit dem Protein werden auch daran gebundene Nucleinsäuren zurückgehalten. Durch Messung der Menge der radioaktiv markierten Nucleinsäuren auf dem Filter schlossen die Autoren auf die Menge an strahleninduzierten DNA-Protein-Quervernetzungen. Von solchen Verbindungen durch die Strahleneinwirkung abgespaltene Nucleinsäurebruchstücke aber können die Membran passieren; dadurch nimmt mit zunehmenden Nucleinsäureabbau die gemessene Menge an Nucleinsäuren auf dem Filter ab, auch wenn die Bildung von Quervernetzungen gleich bleibt oder gar gesteigert auftritt.

Einen entsprechenden Befund für die Ausbeute an Quervernetzungen nach Röntgenbestrahlung von E.coli-Bakterien ermittelte SMITH (1962). Das von ihm durchgeführte Analyse-

verfahren stützt sich auf die selektive Präzipitation von Protein und proteingebundener DNA mittels KCl. Als Maß für die Ausbeute an strahleninduzierten DNA-Protein-Quervernetzungen diente ihm die Abnahme der nicht ausgefällten DNA im Überstand nach Bestrahlung. Auch hierbei mußten von Quervernetzungen stammende DNA-Bruchstücke, die im Überstand erschienen, das Ergebnis verfälschen.

Auch YAMAMOTO (1973a) stellte bei in vitro Untersuchungen über die kovalente Bindung von Tryptophan an DNA bzw. RNA unter Gamma-Bestrahlung fest, daß die Ausbeute an solchen Verbindungen bis zu einer gewissen Dosis zunahm, um dann, bei Dosissteigerung, wieder abzunehmen. Er zentrifugierte die Nucleinsäuren über Dichtegradienten und ermittelte die Menge an Tryptophan, die nach Strahleneinwirkung im Molekulargewichtsbereich der Nucleinsäuren erschien, die folglich an diese Moleküle gebunden sein mußte. An kleinere Nucleinsäurefragmente gebundenes Tryptophan konnte somit nicht erfaßt werden.

Aufgrund derartiger Überlegungen räumen alle genannten Autoren ein, daß die beobachtete Abnahme der Ausbeute an strahleninduzierten Quervernetzungen durch die mit steigender Dosis zunehmenden Kettenbrüche der Nucleinsäuren verursacht wird.

Da auch die vorliegende Arbeit wie die von YAMAMOTO (1973a) mit Hilfe einer Methode durchgeführt wurde, die auf Molekulargewichtsunterschieden beruht, wird zunächst das chromatographische Verhalten der makromolekularen Nucleinsäuren der Zelle nach Bestrahlung unter den jeweiligen Bedingungen betrachtet, um den Einfluß von Abbauprozessen auf die erfaßbare Ausbeute an Quervernetzungen abschätzen zu können. Da bei 260 nm die Absorption im ersten Anteil des Chromatogramms praktisch ausschließlich von der ribosomalen RNA und von lysebedingten DNA-Bruchstücken verursacht wird, kann dies anhand der bei 260 nm ausgemessenen Elutionskurven geschehen.

Nach Bestrahlung intakter Bakterien unter N_2 bei 2 °C zeigt sich eine mit zunehmender Dosis fortschreitende Verlagerung des durch die rRNA hervorgerufene Peaks in Richtung größerer Elutionsvolumina und zudem eine Abnahme des Extinktionsmaximums dieser Peaks (Abb. 10). Es hat folglich eine Abnahme des mittleren Molekulargewichtes der sich in diesem Anteil des Chromatogramms befindlichen Nucleinsäuren stattgefunden. Das bedeutet, daß es mit steigender Dosis zunehmend zu Kettenbrüchen gekommen ist. Bestrahlt man die Bakterien nun unter sonst gleichen Bedingungen bei 37 °C, so findet sich eine sehr diskrete Verminderung der beschriebenen Auswirkungen. Grundsätzlich ist dies durch die enzymatische Reparatur von Strangbrüchen erklärbar, zu der die Bakterien unter anderem durch den Nucleotid-Excisions-Mechanismus befähigt sind. Dieser Reparaturprozess erfordert jedoch Energie und somit einen aktiven Stoffwechsel (LASKOWSKI, 1981). Geht man deshalb davon aus, daß derartige Reparaturen von Nucleinsäureschäden bei 2 °C, einer Temperatur, die den Bakterienstoffwechsel lahmlegt, nicht möglich sind, so zeigt dieser Vergleich, daß auch bei 37 °C etwaige Reparaturen von Strangbrüchen unter den angewandten Bedingungen nur ein vernachlässigbar geringes Ausmaß annehmen können. Vermutlich ist dies vor allem auf den Mangel an Nährsubstrat einige Zeit vor und während der Bestrahlung zurückzuführen.

Keine Auswirkung der Temperatur wurde bei Bestrahlung der Bakterien unter Luft beobachtet. Bei 37 °C und bei 2 °C gleichermaßen erscheint das Chromatogramm als ein Peak mit einem Maximum bei Fraktion 156. Die Nucleinsäuren werden hier also deutlich später eluiert als nach Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen (Abb. 11). Es kann deshalb festgehalten werden, daß der Sauerstoff unter den angewandten Bedingungen für den Abbau von Nucleinsäuren sensibilisierend wirkte.

Nach Bestrahlung von intakten Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase mit 2×10^4 Gy unter N_2 bei $2^\circ C$ wird die bereits erwähnte initiale Schulter des rRNA-Peaks nicht mehr vorgefunden und das Extinktionsmaximum verlagert sich um zehn Fraktionen in Richtung größerer Elutionsvolumina (Abb. 12). Dagegen zeigt sich bei Bakterien aus der stationären Phase nach Strahleneinwirkung unter gleichen Bedingungen eine derartige Verlagerung um nur vier Fraktionen (Abb. 10). Dies weist darauf hin, daß der Nucleinsäureabbau vermehrt auftritt, wenn sich die Bakterien in der Phase des raschen Wachstums befinden, ein Befund, der sich mit der Aussage von UMBREIT (1962) deckt, nach der physiologisch junge Bakterien anfälliger sind gegenüber schädigenden Einflüssen jeglicher Art.

Bestrahltes Cytosol läßt nach chromatographischer Auftrennung gegenüber dem Cytosol aus bestrahlten Bakterien analoge, jedoch etwas verstärkte Veränderungen der bei 260 nm ausgemessenen Elutionskurve erkennen. Die Verstärkung wird insbesondere nach Bestrahlung unter Luft deutlich (Abb. 13). Gleiche Erfahrungen im Hinblick auf Nucleinsäureschäden machten ROTI, STEIN u. CERUTTI (1974) und MEE et al. (1978), die durch Bestrahlung von isoliertem Chromatin bzw. von intakten Zellen feststellten, daß Basenschäden bzw. Kettenbrüche in intakten Zellen in beträchtlich geringerem Ausmaß auftreten als in Chromatin-Lösungen. Wahrscheinlich lassen sich diese Beobachtungen auf zwei ursächliche Faktoren zurückführen:

Während in der intakten Zelle direkter und indirekter Strahleneffekt in etwa gleich groß sind, überwiegt in den wässrigen Cytosol-Lösungen bei weitem die indirekte Strahlenwirkung. Das bedeutet, daß in diesen Lösungen unter Bestrahlung in weit größerem Ausmaß primäre Radiolyseprodukte des Wassers, darunter auch OH-Radikale, gebildet werden als in

der Zelle. Die Häufigkeitswahrscheinlichkeit aber, daß es durch Einwirkung von OH-Radikalen letztlich zu Strangbrüchen kommt, ist größer als die, daß dies durch direkte Wechselwirkung der Nucleinsäuren mit energiereichen Quanten bzw. schnellen Elektronen herbeigeführt wird.

In der intakten Zelle sind die Nucleinsäuremoleküle allseitig von Proteinen umgeben, die einen protektiven Effekt gegen die indirekte Strahlenwirkung entfalten. SCHÜSSLER (1982a) konnte durch Röntgenbestrahlung von DNA-Lösungen bzw. DNA-Rinderserumalbumin-Lösungen zeigen, daß in Anwesenheit des Proteins der strahleninduzierte DNA-Abbau erheblich vermindert ist. Dieser Schutzeffekt tritt bei Bestrahlung unter N_2 stärker in Erscheinung als unter O_2 . Bedenkt man nun, daß bei der Bestrahlung des isolierten Cytosols die Zellinhaltsbestandteile in relativ verdünnter Lösung vorliegen, so ergibt sich die Folgerung, daß hierbei die Abschirmung der Nucleinsäuren durch Proteine aufgrund der veränderten Konzentrationsverhältnisse im Vergleich zur intakten Zelle geringer wird.

Auffallend ist der Verlauf der Elutionskurve nach Bestrahlung des Cytosols mit 6×10^4 Gy unter N_2 bei 2 °C. Denn obwohl gerade der vermehrte Abbau von Nucleinsäuren nach Bestrahlung von Cytosol diskutiert wurde, findet sich hier im ersten Anteil des Chromatogramms eine bei Fraktion 100 beginnende langgezogene Schulter, die nach Bestrahlung von Bakterien unter gleichen Bedingungen nicht auftritt (Abb. 13). Ein sehr ähnliches Chromatogramm erhält man nach Bestrahlung des kompletten Zell-Lysates (Abb. 15). Bei diesen Versuchen hat, verglichen mit dem Ergebnis nach Bestrahlung intakter Bakterien unter entsprechenden Bedingungen, in ausgeprägtem Umfang eine Molekülvergrößerung stattgefunden. Da anzunehmen ist, daß auch hier wie bei den anderen Versuchen Nucleinsäuren abgebaut wurden, erkennbar durch die

Verlagerung des Extinktionsmaximums zu einer größeren Fraktionsnummer, müßte die Molekülvergrößerung zumindest teilweise auf Zellproteine zurückzuführen sein. Diese absorbieren zwar hauptsächlich bei 280 nm, z.T. jedoch auch bei 260 nm. Daß es sich bei den vergrößerten Molekülen tatsächlich um Proteine handelt, ist aus der dazugehörigen Proteinbestimmungskurve zu ersehen. Eine Zunahme des Molekulargewichtes von Proteinen bedeutet, daß sich Aggregate gebildet haben, an denen Proteine beteiligt sind.

4.3.3 Veränderungen des Elutionsverhaltens der Zellproteine

Die Tabellen II und III verdeutlichen, daß in Abhängigkeit von den jeweiligen Bestrahlungsbedingungen in wechselndem Ausmaß Zellproteine bei der Gelfiltration früher eluiert werden als dies bei der unbestrahlten Probe der Fall ist. Folglich wurde durch Röntgenstrahlung eine Zunahme des Molekulargewichtes von Proteinen induziert. Unter bestimmten, für die verfrühte Elution der Proteine innerhalb der vorliegenden Versuchsreihe optimalen Bedingungen (Abb. 15), erscheinen ca. 14 % der Zellproteine mit Elutionsvolumina, die einem Molekulargewicht von ca. 10^5 bis 10^8 Daltons entsprechen, wie sich mit Hilfe der Eichgeraden (Abb. 3) berechnen läßt. Die löslichen Proteine des Zellinnern von E.coli-Bakterien besitzen aber im Mittel ein Molekulargewicht von 22.000 bis 26.000 Daltons (JESSBERGER, 1979). Außerdem wiesen KIEHN u. HOLLAND (1970) nach, daß Proteinmoleküle mit einem Molekulargewicht von 80.000 und mehr nur 3 % ausmachen. Die größten, von POLLARD (1970) beschriebenen Zellproteine von E.coli haben ein Molekulargewicht von ca. 2×10^5 Daltons. Dementsprechend dürften bei der gelchromatographischen Auftrennung des unbestrahlten Präparates unter den angewandten Bedingungen Zellproteine frühestens etwa bei Fraktion 130

eluiert werden. Dies ist, wie Abb. 5 erkennen läßt, auch der Fall. Wie ist es nun aber möglich, daß die Proteine nach Bestrahlung anscheinend ein Molekulargewicht bis zu ca. 10^8 Daltons aufweisen? Wäre diese Molekülvergrößerung allein durch die Aggregation von Zellproteinen miteinander bedingt, so hätten sich hierfür ca. 1.000 der größten Proteine zusammenlagern müssen bzw. ca. 10.000 der Proteine mittlerem Molekulargewichtes. Da dies sehr unwahrscheinlich ist, darf mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, daß es sich hierbei um Verbindungen von Proteinen mit Nucleinsäuren bzw. deren Bruchstücke handelt, denn ribosomale RNA der E.coli-Zellen besitzt ein Molekulargewicht von $5,5 \times 10^5$ bis $1,1 \times 10^6$ Daltons (BUDDECKE, 1977), die komplette bakterielle DNA, wie sie leider nach der Ultraschall-Lyse nicht mehr vorgefunden wird, das enorme Molekulargewicht von $2 - 3 \times 10^9$ Daltons (BACHMANN, 1976). Bei diesen Quervernetzungen muß es sich um kovalente Bindungen handeln, da alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen durch die Einwirkung des SDS aufgehoben werden.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß in vitro locker ionisierende Strahlen die Bildung von Quervernetzungen zwischen Makromolekülen, insbesondere zwischen Protein-Protein, RNA-Protein und DNA-Protein induzieren (KASCHE, 1974; SCHÜSSLER, 1976; MINSKY u. BRAUN, 1977; EKERÍ u. GIOCANTI, 1977; YAMAMOTO, 1977; SCHÜSSLER, 1982). Nach Röntgenbestrahlung von intakten E.coli-Bakterien beobachtete SMITH (1962) einen Verlust der DNA-Extrahierbarkeit und erklärte dies mit der strahleninduzierten Entstehung von DNA-Protein-Verbindungen. BOHNE et al. (1970) und HAWKINS (1975) fanden DNA-Protein-Quervernetzungen nach Bestrahlung von Bakteriophagen. Aufgrund von Experimenten mit Eukaryonten-Zellen vermutete YAMAMOTO (1975a) kovalente Quervernetzungen zwischen RNA und Protein nach Gamma-Bestrahlung. Außerdem schien es,

daß auch DNA mit Protein bzw. RNA verbunden wurde, jedoch in geringerem Ausmaß. MEE u. ADELSTEIN (1979) berichten von Quervernetzungen zwischen DNA und Protein durch Gamma-Bestrahlung von intakten Eukaryonten-Zellen bzw. von isoliertem Chromatin aus solchen Zellen. Schließlich diskutierte JESSBERGER (1979) die durch Röntgenbestrahlung von E.coli-Bakterien hervorgerufene Molekulargewichtszunahme von Zellproteinen als Vernetzung von Proteinen untereinander und mit anderen Makromolekülen der Zelle.

Durch diese Angaben aus der Literatur wird die Annahme, die aufgrund der eigenen Versuchsergebnisse entstand, daß es durch die Röntgenbestrahlung sowohl von intakten Bakterien als auch von primär isoliertem Cytosol in unterschiedlichem Ausmaß zur Ausbildung von kovalenten Quervernetzungen zwischen Proteinen und Proteinen-Nucleinsäuren bzw. deren Bruchstücken kommt, bestärkt. Wovon hängt nun aber die Ausbeute an derartigen Strahlenprodukten ab?

Ein Vergleich der in Tabelle II und III angegebenen Werte läßt erkennen, daß die Vergrößerung der Proteinmoleküle bei Bestrahlung des Cytosols in größerem Maße auftritt. Eine ähnliche Beobachtung machten MEE u. ADELSTEIN (1979), die feststellten, daß bei der Bestrahlung von intakten Zellen eine ca. hundertmal höhere Dosis nötig ist, um die gleiche Ausbeute an DNA-Protein-Quervernetzungen zu erreichen, als bei Bestrahlung des isolierten, nicht dissoziierten Chromatins. Die Autoren vermuten, daß dafür entweder die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse oder schützende Moleküle in der Zelle verantwortlich sind. Auch YAMAMOTO (1975a) meint, daß es im Zell-Lysat möglicherweise in größerem Umfang zur Bindung zellulärer Bestandteile an Nucleinsäuren kommt als in der intakten Zelle.

Bei Betrachtung dieser Werte sind drei weitere Befunde zu beachten.

- Nach Bestrahlung von Bakterien bei 37 °C erhält man einen deutlich geringeren Anteil an verfrüht eluiertem Protein als nach Bestrahlung bei 2 °C. Folglich scheint die Bestrahlungstemperatur einen Einfluß auf die Ausbeute an Quervernetzungen zwischen den Biomolekülen auszuüben. SMITH (1975) schreibt, daß bei UV-Bestrahlung von bestimmten E.coli-Stämmen (darunter auch K-12 AB 1157) bei - 79 °C mehr DNA-Protein-Quervernetzungen auftreten als bei + 21 °C. Er erklärt dieses Phänomen mit der Annahme, daß bei Zimmertemperatur DNA und Proteine der Zellen nicht in einer optimalen Position zueinander vorliegen, um miteinander zu reagieren. Sind die Zellen gefroren, soll dies aber der Fall sein. Nun ist zwar die UV-Bestrahlung nicht vorbehaltlos mit der Röntgenstrahlung vergleichbar und außerdem befinden sich die Zellen bei den eigenen Versuchen oberhalb des Gefrierpunktes, jedoch kann davon ausgegangen werden, daß die intrazellulären Molekularbewegungen schon bei 2 °C wesentlich vermindert sind. Die Erklärung dieses Autors mag deshalb wohl auch für die eigenen Ergebnisse zutreffen, zumal auch EKERT u. GIUCANTI (1977) und MEE u. ADELSTEIN (1979) bei der Anwendung von Gamma-Strahlen auf die Bedeutung der räumlichen Beziehung der Makromoleküle zueinander hinweisen.
- Die Bestrahlung des Cytosols unter Luft erbringt bei der niedrigeren Dosis mehr verfrüht eluiertes Protein als bei der Höchstdosis, was sich zweifellos auf den außerordentlich starken Abbau der Nucleinsäuren bei 6×10^4 Gy zurückführen läßt (Abb. 14). Etwaige Quervernetzungen zwischen Nucleinsäurebruchstücken und Protein können aufgrund des durch die Kettenbrüche insgesamt zu geringen Molekulargewichtes solcher Aggregate nicht mehr von der Proteinfraction isoliert und getrennt erfaßt werden. Bei der

Beurteilung der Ausbeute an makromolekularen Quervernetzungen, die beim angewandten Verfahren der Gelfiltration nur als Molekülvergrößerungen erkennbar werden können, muß also immer auch das Ausmaß der gegenläufigen Erscheinung des Molekülabbbaus unter den jeweiligen Bedingungen berücksichtigt werden (siehe auch 4.3.2). Wegen der unübersichtlichen Vielfalt der Zellinhaltsbestandteile ist dies jedoch bei den vorliegenden Untersuchungen an komplexen Zellsystemen nur näherungsweise machbar. Deshalb erscheint die Berechnung von G-Werten für die strahleninduzierte Verknüpfung zwischen Proteinen und Nucleinsäure-Proteinen auf der Basis des verfrüht eluierten Proteinanteils zweifelhaft.

- Bei der Bestrahlung von Cytosol in Anwesenheit der Zellhüllen ergibt sich eine geringere Menge an vergrößerten Proteinen, obwohl sich das Ausmaß des Nucleinsäureabbbaus nicht entscheidend ändert (Abb. 15). Vermutlich weist dies auf die hemmende Wirkung von Kohlenhydraten auf die Bildung von Molekülaggregaten hin, die von DELINCEE u. JAKUBICK (1977) in ihrer Arbeit über die strahleninduzierte Aggregation von Proteinen beschrieben wurde. Die Zellhüllen nämlich enthalten zueinem erheblichen Anteil Glykoside.

4.3.4 Einfluß von Sauerstoff auf die strahleninduzierten Veränderungen

In Abschnitt 4.3.2 wurde gezeigt, daß die Anwesenheit von Sauerstoff während der Bestrahlung das Ausmaß der Verkleinerung von Nucleinsäuren erhöht. Diese sensibilisierende Wirkung des Sauerstoffs auf den strahleninduzierten Abbau von Nucleinsäuren ist seit langem bekannt. DALE (1966) meint, daß der Sauerstoffeffekt für biologische Objekte ein beinahe universales Phänomen darstellt. Aufgrund von neuesten

in vitro Untersuchungen stellt SCHÜSSLER (1982a) darüberhinaus fest, daß ein derartiger Effekt des Sauerstoffes nur dann in Erscheinung tritt, wenn die Nucleinsäuren in Gegenwart von Protein bestrahlt werden, nicht jedoch bei der Bestrahlung von reinen Nucleinsäurelösungen. Da bei den vorliegenden Untersuchungen die Bestrahlung der Nucleinsäuren stets in Anwesenheit der Zellproteine erfolgte, widersprechen die erzielten Ergebnisse nicht dieser Feststellung.

Jedoch ist auch bekannt, daß Sauerstoff hinsichtlich bestimmter strahlenbedingter Reaktionen nicht sensibilisierend oder sogar hemmend wirkt (ALEXANDER, 1966; BRUSTAD, 1966). Verschiedene Autoren sind durch in vitro Untersuchungen zu der Ansicht gelangt, daß letzteres auch für die durch locker ionisierende Strahlen herbeigeführte kovalente Verknüpfung von Makromolekülen bzw. deren Bestandteilen zutrifft (YAMAMOTO, 1973b; YAMAMOTO u. OKUDA, 1975; EKERT u. GIOCANTI, 1977; MINSKY u. BRAUN, 1977; SCHÜSSLER, 1982a; SCHÜSSLER, 1982b).

Diese Erfahrung konnte aufgrund der eigenen Versuche nicht nachvollzogen werden, d.h., es wurde kein eindeutiger Sauerstoffschutz hinsichtlich der strahleninduzierten Vernetzung von Biomolekülen erkennbar. Zwar ist nach Bestrahlung von Cytosol unter N_2 der verfrüht eluierte Proteinanteil jeweils größer als nach Bestrahlung unter Luft (Tabelle III), jedoch könnte dies auf den dabei geringeren Abbau von Nucleinsäuren zurückzuführen sein (Abb. 14). Bei Bestrahlung intakter Bakterien findet sich unter Luft sogar ein größerer Proteinanteil vorzeitig eluiert als nach Strahleneinwirkung unter N_2 bei sonst gleichen Bedingungen (Tabelle II). Möglicherweise ist dieser Befund zumindest teilweise durch eine ausgeprägte Sauerstoffverarmung in der Zelle unter Bestrahlung bedingt. Denn, wie in 4.2 bereits ausführlich beschrieben, ist auch während der Bestrahlung unter Luft

mit einer für den Sauerstoffeffekt unteroptimalen O_2 -Sättigung in der Suspension zu rechnen. Eine geringere Sauerstoffspannung im umgebenden Medium bedeutet eine niedrigere Diffusionsrate von O_2 in die Zelle. Auch hier findet aber eine strahlenbedingte Sauerstoffverarmung statt. Zudem sind einige Zellinhaltsbestandteile, z.B. ungesättigte Fettsäuren, sehr potente O_2 -Rezeptoren, was zusätzlich zu einen wirkungsvollen Sauerstoffverbrauch führt (YAMAMOTO, 1975a). Man muß also davon ausgehen, daß während der Bestrahlung in der Zelle eine noch wesentlich niedrigere Sauerstoffkonzentration besteht als im umgebenden Suspensionsmittel. Auf ähnliche Weise könnten die entsprechenden Ergebnisse von YAMAMOTO (1975a) erklärt werden, der bei Untersuchungen über strahleninduzierte Verbindungen von Protein- und Nucleinsäurebestandteilen mit Makromolekülen in intakten Zellen bzw. Zell-Lysaten keine hemmende Wirkung von Sauerstoff feststellen konnte.

MEE u. ADELSTEIN (1979) bestrahlten Eukaryonten-Zellen bzw. isoliertes Chromatin aus solchen Zellen jeweils unter N_2 , Luft und N_2O . Sie fanden dabei, daß es unter allen Atmosphären zu einer deutlichen Bildung von DNA-Protein-Quervernetzungen kommt, jedoch zu keinem signifikanten Unterschied bei der Bestrahlung unter Luft bzw. N_2 . Sehr wahrscheinlich wirkte sich auch hierbei der Effekt der Sauerstoffverarmung unter Bestrahlung aus, zumal diese Autoren immer in geschlossenen Gefäßen bestrahlen (SCHÜSSLER, persönliche Mitteilung), so daß verbrauchter Sauerstoff nicht aus der Außenluft ersetzt werden kann. Die größte Bindungsausbeute erzielten sie durch Strahleneinwirkung unter N_2O . Da hierbei fast ausschließlich das OH-Radikal als primäres Strahlenprodukt vorliegt, folgerten sie, daß hauptsächlich dieses Radikal für die Quervernetzung zwischen den Makromolekülen verantwortlich ist. Dieser Ansicht ist auch YAMAMOTO (1975b). Er berichtet, daß bei der Bildung von Nucleinsäure-Protein-Quervernetzungen vermutlich strahleninduzierte Aminosäure-Radikale

mit Radiolyseprodukten der Pyrimidin- und Purinbasen reagieren. Die strahleninduzierten reagiblen Produkte der Nucleinsäurebasen aber werden seinen Untersuchungen zufolge durch die Einwirkung von OH-Radikalen oder auch H-Radikalen erzeugt. Ebenso verursachen vor allem die OH-Radikale die Entstehung von Radikalen aus aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren. Geht man von dieser Vorstellung aus und bedenkt man gleichzeitig, daß es zu einer desensibilisierenden Wirkung des Sauerstoffs wahrscheinlich immer nur dann kommt, wenn die Schädigung vor allem auf hydratisierte Elektronen und H-Radikale zurückzuführen ist (4.3.1), so erscheint es einleuchtend, daß bei der strahleninduzierten Bildung von Molekülaggagaten kein Sauerstoffschutz erkennbar wird. Anderer Auffassung über den Mechanismus der strahleninduzierten Veränderungen von Nucleinsäuren in der Zelle ist jedoch SCHÜSSLER (1982b) aufgrund ihrer in vitro Untersuchungen. Sie fand Hinweise dafür, daß sowohl der Abbau von DNA in Gegenwart von Proteinen als auch die DNA-Protein-Quervernetzung nicht durch Reaktionen mit Primärradikalen, sondern durch Proteinradikale bewirkt wird. Wegen der Geschwindigkeitskonstanten für Reaktionen der Primärradikale mit DNA bzw. Protein und der vorliegenden Konzentrationsverhältnisse nimmt die Autorin an, daß alle Primärradikale vom Protein abgefangen werden, so daß nur Proteinradikale entstehen. In Abwesenheit von Sauerstoff führt die Weiterreaktion dieser Strahlenprodukte der Proteine mit Nucleinsäuren überwiegend zu einer Quervernetzung. Ist aber Sauerstoff vorhanden, so lagert sich dieser an die Proteinradikale an und verhindert damit weitgehend die Bildung von Protein-Nucleinsäure-Verknüpfungen.

Wie nun die Untersuchungsergebnisse anhand von komplexen Zellsystemen mit den oben genannten in vitro Untersuchungen bis ins Letzte in Einklang zu bringen sind, bleibt in Zukunft noch genauer abzuklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

E.coli-Bakterien K-12 AB 1157 und isoliertes Cytosol aus diesen Bakterien wurden in 1×10^{-2} M Phosphatpuffer, pH 7, unter Stickstoff und unter Luft bei 2 °C oder 37 °C einer Röntgenbestrahlung mit Dosen bis zu 6×10^4 Gy ausgesetzt.

Die Lyse der Bakterien wurde mit dem enzymatischen Aufschlußverfahren mittels Lysozym oder mit Hilfe von Ultraschall durchgeführt, wobei sich die letztere Methode als vorteilhafter erwies.

Nach der Bestrahlung wurden zunächst UV-Absorptionsspektren des mit 1 % SDS versetzten Cytosols aufgezeichnet, wodurch gezeigt werden konnte, daß es unter Strahleneinwirkung zu zwei gegenläufigen Konkurrenzreaktionen kommt, nämlich zum Abbau von Nucleinsäuren und zur Bildung größerer Moleküle. Hierbei war bei Bestrahlung unter Luft der Nucleinsäureabbau der dominierende Vorgang, bei Bestrahlung unter Stickstoff die Molekülvergrößerung.

Bestätigt wurde dieser Befund durch die anschließende gel-chromatographische Auftrennung des Cytosols. Durch spektral-photometrischen Nachweis der Nucleinsäuren und kolorimetrische Bestimmung der Proteine im Eluat wurde gefunden, daß es mit steigender Strahlendosis zunehmend zu einer Verlagerung des Nucleinsäure-Peaks im Chromatogramm in Richtung größerer Elutionsvolumina kam, was einer strahleninduzierten Molekulargewichtsabnahme dieser Substanzen entspricht; gleichzeitig wurden mit zunehmender Energiedosis die Zellproteine schneller eluiert. Das bedeutet eine scheinbare strahlenbedingte Vergrößerung der Proteinmoleküle, die als Vernetzung von Proteinen untereinander und, aufgrund der z.T. enormen Molekulargewichtszunahme, mit Nucleinsäuren gedeutet wurde. Beide Strahlenwirkungen traten nach Bestrahlung von isoliertem Cytosol stärker in Erscheinung als nach Bestrahlung von intakten Bakterien. Ferner zeigte sich eine Abhängigkeit der

Effekte von der Bestrahlungstemperatur. Erfolgte die Strahleneinwirkung auf Bakterien bei 2 °C, so traten sie deutlicher hervor als nach Bestrahlung bei 37 °C. Dies gilt insbesondere für die Entstehung makromolekularer Quervernetzungen.

Der strahleninduzierte Abbau von Nucleinsäuren wurde nach Strahleneinwirkung unter Sauerstoff in größerem Umfang gefunden als unter Stickstoff. Dagegen konnte für die Bildung kovalenter Quervernetzungen zwischen Makromolekülen des Zellinhaltes in beiden bestrahlten Systemen weder eine sensibilisierende noch eine desensibilisierende Wirkung des Sauerstoffs eindeutig festgestellt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALEXANDER, P. (1966):

Changes in macromolecules produced by ionizing radiations.

In: Handbuch der medizinischen Radiologie, Bd. 2, Strahlenbiologie.

Herausgeg. von L. Diethelm, Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

ALEXANDER, P., H. MOROSON (1962):

Nature 194, 882.

BACHMANN, K. (1976):

Biologie für Mediziner.

Springer, Berlin-Heidelberg-New York. S. 104

BHATTACHARJEE, S.B. (1961):

Radiat. Res. 14, 50.

BIRDSELL, D.C., E.H. COTA-ROBLES (1967):

J. Bact. 93, 427.

BOHNE, L., T. COQUERELLE, U. HAGEN (1970):

Int. J. Radiat. Biol. 17, 205.

BRUSTAD, T. (1966):

Radiat. Res. 27, 456.

BUDDECKE, E. (1977):

Grundriss der Biochemie.

Walter de Gruyter, Berlin, S. 98.

BURTON (1956):

Biochem. J. 62, 315.

DALE, W.M. (1966):

Direct and indirect effects of ionizing radiations.

In: Handbuch der medizinischen Radiologie, Bd. 2, Strahlenbiologie.

Herausgeg. von L. Diethelm, Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

DAVIDSON, J.N. (1965):

The biochemistry of nucleic acids. London.

DELINCÉE, H., V. JAKUBICK (1977):

Int. J. of Appl. Rad. and Isotopes 28, 939.

DENKL, C.P. (1971):

Dissertation, Erlangen.

DERTINGER, H., H. JUNG (1969):

Molekulare Strahlenbiologie.

Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

DEUBER, H.-J. (1982):

Dissertation, Erlangen.

DRAGANIC, J.G. (1971):

The Radiation Chemistry of Water.

Academic Press, New York and London.

EICHHORN, H.-M. (1973):

Dissertation, Erlangen.

EKERT, B., N. GIOCANTI (1977):

Int. J. Radiat. Biol. 31, 303.

FISCHER, W. (1977):

Physiologisch-Chemisches Praktikum. Erlangen.

HART, E.J., J.W. BOAG (1962):

J. Amer. Chem. Soc. 84, 4090.

HAWKINS, R.B. (1975):

Ionizing radiation induced covalent protein to DNA cross-links in coliphage T 7.

In: Protein and their Adducts to DNA: Their Significance to Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology, Williamsburg, Virginia.

HUG, O. (1974):

Medizinische Strahlenkunde.

Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

HUTCHINSON, F., A. PRESTON; B. VOGEL (1957):

Radiat. Res. 7, 465.

JESSBERGER, B..(1979):

Dissertation, Erlangen.

KASCHE, V. (1974):

Int. J. Radiat. Biol. 26, 455.

KEENE, J.P. (1963):

Nature, London, 197, 47.

KIEFER, J. (1981):

Biologische Strahlenwirkung.

Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

KIEHN, E.D., J.J. HOLLAND (1970):

Nature, London, 226, 544.

KNIPPERS, R., W. STRÄTLING (1970):

Nature, London, 226, 713.

LASKOWSKI, W. (1981):

Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur.

Walter de Gruyter, Berlin.

MEE, L.K., S.J. ADELSTEIN (1978):

Int. J. Radiat. Biol. 33, 443.

MEE, L.K., S.J. ADELSTEIN (1979):

Int. J. Radiat. Biol. 36, 359.

MINSKY, B.D., A. BRAUN (1977):

Radiat. Res. 71, 505.

OKAZAKI, R., K. SUGIMOTO; T. OKAZAKI; Y. IMAE, A. SUGINO (1970):

Nature, London, 228, 223.

POLLARD, E.C. (1970):

The effect of ionizing radiation on the molecular
biology of Escherichia coli.

In: Current Topics in Radiation Research, Vol. 6.

REYNOLDS, J.A., C. TANFORD (1970):

Proc. Natl. Acad. Sci. 66, 1002.

ROBERTSON, W.R. (1976):

Ph. D. Thesis, University of London.

ROBERTSON, W.R., W.A. CRAMP, D.K. WATKINS (1978):

Int. J. Radiat. Biol. 34, 101.

ROTI, J.L., G.S. STEIN, P.A. CERUTTI (1974):

Biochemistry, New York, 13, 1900.

SCHACHINGER, L. (1962):

In: Medizinische Strahlenkunde

Springer, Berlin-Heidelberg-New York

Herausgeg. von O. Hug, 1974.

SCHAECHTER, M. (1975):

Attachment of Chromosomes to Membranes in Bacteria
and Animal Cells.

In: Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology.

Herausgeg. von K.C. Smith, Plenum Press, New York and
London.

SCHÜSSLER, H. (1976):

Habilitation, Erlangen.

SCHÜSSLER, H. (1982a):

Radiolysis of DNA with and without protein.

Presented at the XVIIth Annual Meeting of the European
Society of Radiation Biology, Bordeaux 1982.

SCHÜSSLER, H. (1982b):

Strahleninduzierte Wechselwirkung von Proteinen und
Nucleinsäuren.

Anlage zum Arbeitsbericht an die Deutsche Forschungsge-
sellschaft.

SMITH, D.W., H. SCHALLER, E. BONHOEFFER (1970):

Nature, London, 226, 711.

SMITH, K.C. (1962):

Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 157.

SMITH, K.C. (1975):

Radiation Induced Cross-Linking of DNA and Protein
in Bacteria.

In: Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology.
Herausgeg. von K.C. Smith, Plenum Press, New York
and London.

STRÄTLING, W., R. KNIPPERS (1971):

Eur. J. Biochem. 20, 330.

TANOOKA, H., F. HUTCHINSON (1965):

Radiat. Res. 24, 43.

UMBREIT, W.W. (1962):

Modern Microbiology.

W.H. Freeman and Company, San Francisco and London.

WANG, C., R.L. SMITH (1975):

Anal. Biochem. 63, 414.

WATSON, J.D. (1976):

Molecular Biology of the Gene. New York.

WEISS, J. (1944):

Nature 153, 748.

WHEELER, C.M. (1978):

Changes in the Secondary and Tertiary Structures of
DNA after Irradiation.

In: Effects of Ionizing Radiation on DNA.

Herausgeg. von J. Hüttermann, W. Köhnlein, R. Téoule,
Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

WHILLANS, D.W., A.M. RAUTH (1980):

Radiat. Res. 84, 97.

YAMAMOTO, O. (1973a):

Int. J. Radiat. Phys. Chem. 5, 213.

YAMAMOTO, O. (1973b):

Radiat. Res. 54, 398.

YAMAMOTO, O. (1975a):

Radiat. Res. 61, 261.

YAMAMOTO, O. (1975b):

Ionizing Radiation-Induced DNA-Protein Cross-Linking.

In: Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology.

Herausgeg. von K.C. Smith, Plenum Press, New York and London.

YAMAMOTO, O. (1977):

Ionizing Radiation-Induced Crosslinking in Proteins.

In: Protein Crosslinking, Part A, 31, 509.

Herausgeg. von Mendel Friedmann, P.P.C.

YAMAMOTO, O., A. OKUDA (1975):

Radiat. Res. 61, 251.

ZEICHNER, M., R. STERN (1977):

Biochem. 16, 1378.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung von seiten des Instituts.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. H. Schüßler, unter deren Führung und Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Frau Dr. Schüßler hat durch sachverständige Anregungen und durch ihre stets freundliche und tatkräftige Hilfsbereitschaft das Gelingen dieser Arbeit ganz wesentlich gefördert.

LEBENS LAUF

Am 15.4.1956 wurde ich, Rudolf Michael Großkopf, in Adelsdorf als Sohn des Metallarbeiters Johann Großkopf und seiner Ehefrau Katherina, geb. Schlagenhaft, geboren. Von 1962 bis 1967 besuchte ich die Volksschule in Adelsdorf, von 1967 bis 1976 das Gymnasium in Höchststadt a.d. Aisch, wo ich 1976 das Abitur im neu-sprachlichen Zweig ablegte. Nach Ableistung eines Teils des Wehrdienstes begann ich im Sommersemester 1977 an der Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Medizin, das ich im Frühjahr 1983 mit dem Staatsexamen abschloß.

